

10/030794

PCT/JP 00/04261 #2

## 日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

25.07.00

REC'D 04 AUG 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

EJU

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 6月29日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第183195号

出 願 人

Applicant(s):

酒井 敏行  
日本化薬株式会社

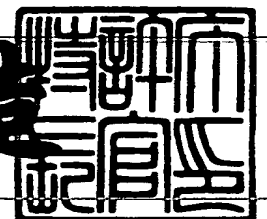
## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 7月14日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3055619

【書類名】 特許願

【整理番号】 DA-02792

【提出日】 平成11年 6月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府京都市左京区松ヶ崎小脇町 28-1

    【氏名】 酒井 敏行

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県大宮市北袋町 2-336

    【氏名】 加々谷 重英

【発明者】

    【住所又は居所】 埼玉県与野市上落合 6-8-22

    【氏名】 佐藤 学道

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都中野区江原町 2-21-15-102

    【氏名】 助永 義和

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都渋谷区本町 3-48-21-1201

    【氏名】 藤井 秀二

【特許出願人】

    【住所又は居所】 京都府京都市左京区松ヶ崎小脇町 28-1

    【氏名又は名称】 酒井 敏行

【特許出願人】

    【識別番号】 000004086

    【氏名又は名称】 日本化薬株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100066692

【弁理士】

【氏名又は名称】 浅村 皓

【選任した代理人】

【識別番号】 100072040

【弁理士】

【氏名又は名称】 浅村 肇

【選任した代理人】

【識別番号】 100088926

【弁理士】

【氏名又は名称】 長沼 暉夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100102897

【弁理士】

【氏名又は名称】 池田 幸弘

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 002901

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 癌抑制遺伝子p51プロモーター領域をコードする遺伝子及びその用途

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (1)、(2)、(3)、(4)、(5) 又は (6) に示すp51プロモーター領域をコードする遺伝子：

- (1) 配列表の配列番号：1 に示す塩基配列を有するp51プロモーター領域をコードするDNA；
- (2) 配列表の配列番号：1 に示す塩基配列において1 もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつp51プロモーター能を有するDNA；
- (3) 配列表の配列番号：1 に示す塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつp51プロモーター能を有するDNA；
- (4) 配列表の配列番号：2 に示す塩基配列を有する、p51プロモーター領域及びp51の5 ダッシュ末端側非翻訳領域をコードするDNA；
- (5) 配列表の配列番号：2 に示す塩基配列において1 もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつp51プロモーター能を有するDNA；
- (6) 配列表の配列番号：2 に示す塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつp51プロモーター能を有するDNA。

【請求項 2】 以下の (7)、(8) 又は (9) に示すp51の5 ダッシュ末端側非翻訳領域をコードする遺伝子：

- (7) 配列表の配列番号：2 に示す塩基配列における5 6 7 7 番目から5 9 6 0 番目の塩基配列を有するDNA；
- (8) 配列表の配列番号：2 に示す塩基配列における5 6 7 7 番目から5 9 6 0 番目の塩基配列において1 もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつ上記 (7)

のDNAと同様の機能を有するDNA；

- (9) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5677番目から5960番目の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ上記(7)のDNAと同様の機能を有するDNA。

【請求項3】 請求項1の遺伝子を含むことを特徴とする組換え体プラスミド。

【請求項4】 請求項3の組換え体プラスミドを含む形質転換体又は形質導入体。

【請求項5】 請求項1又は2の遺伝子の全部又は部分からなる核酸プローブ。

【請求項6】 請求項5の核酸プローブを用いることを特徴とするp51プロモーター領域、またはその類似遺伝子のクローニング方法。

【請求項7】 請求項1又は2の遺伝子の全体又は部分に対してアンチセンスであり、p51遺伝子の発現を上昇あるいは阻害するDNA配列。

【請求項8】 請求項1又は2の遺伝子の全体又は部分に対してアンチセンスであり、p51遺伝子の発現を上昇あるいは阻害するRNA配列。

【請求項9】 請求項4の形質転換体又は形質導入体を用いたp51プロモーターに作用する薬剤のスクリーニング方法。

【請求項10】 請求項9のスクリーニング方法により選択された、p51遺伝子の発現を上昇あるいは阻害する化合物。

【請求項11】 請求項1のDNA配列、請求項7のDNA配列、又は請求項8のRNA配列を含むことを特徴とする医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞死誘導能を有する蛋白質p51のプロモーター領域をコードする遺伝子及びp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードする遺伝子に関する。

また、本発明は、これら遺伝子の一連の用途に関する。

【0002】

## 【従来の技術】

癌抑制遺伝子p53はアポトーシス誘導能、細胞周期停止能、DNA傷害修復能など多様な機能を有する蛋白質をコードしている。また、p53は転写因子であり、様々な蛋白質の発現を制御していることが分かってきた。現在、この蛋白質は細胞増殖制御に中心的な機能を果たしていると考えられている。また、癌細胞においては、約半数でp53の変異が認められ、異常増殖や制癌剤耐性の主因となっていることが報告されてきている。ごく最近まで、p53様の構造、機能を有する蛋白質は全く知られていなかったが、近年二つの新規p53様分子が報告された。一つはp73 (Cell誌 第90巻 809-819頁 1997年) であり、もう一つが、p51 (Nature Medicine誌 第4巻 839-843頁 1998年) である。p51に関しては、同一遺伝子にコードされる蛋白質がp63の名称で報告されている (Molecular Cell誌、第2巻、305-316頁、1998年)。p51は構造的にp53に極めて類似しており、また、p53同様、細胞周期進行抑制蛋白質p21の転写活性化能を有していることから機能的にもp53と相同であることが示唆されている。さらにp51は、p53同様、細胞死誘導能、細胞増殖抑制能等を有していることが報告されている。しかし一方、p53と異なり、p51は癌細胞においてもほとんど変異が認められないことが示されている。従って、p51の転写を増強するような物質は、p53が変異した癌細胞にも細胞増殖阻害効果を示す新規制癌剤となると考えられる。また、p51は、筋肉細胞等、ごく限局された臓器にのみ発現していることが明らかになっている。従って、p51プロモーターは、例えば遺伝子治療等で、特定臓器にのみ目的遺伝子を発現させるためのプロモーターとして極めて有用であると考えられるが、その構造は現在まで全く明らかになっていない。

【0003】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、癌抑制遺伝子p51のプロモーター領域をコードする遺伝子及びp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードする遺伝子を明らかにし、これら遺伝子のクローニング方法を提供すること、さらにこれら遺伝子を用いた新規薬剤探索方法を提供すること、さらにこれら遺伝子を用いた新規遺伝子治療方法

を提供すること等である。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、ヒトゲノムライブラリ中にp51プロモーターを含む遺伝子断片を見出すべく鋭意研究し、p51プロモーター領域を有する遺伝子配列、並びにp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードする遺伝子配列を決定し、本発明を完成した。

【0005】

即ち、p51mRNAに相補的なcDNAと同様の配列を含むヒトゲノム断片を、ブラークハイブリダイゼーションスクリーニング法により検索し、採取した。さらに、この遺伝子断片の塩基配列を決定することによって、この中にp51プロモーター領域及びp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域と推定される領域が含まれていることを確認した。さらに、この遺伝子断片をルシフェラーゼレポーター遺伝子と接続したプラスミドを構築し、これをヒト細胞株に導入した形質転換体を作製した。更に、この形質転換体を解析することによって、該遺伝子がプロモーター能を有することを見出した。また、これらを用いたp51プロモーターに作用する物質のスクリーニング方法、及びこのプロモーター活性を増強する薬剤が、p53依存性アポトーシス異常が関与する疾患の治療薬、例えば制癌剤となる可能性を見出した。

【0006】

従って、本発明は、以下の(1)、(2)、(3)、(4)、(5)又は(6)に示すp51プロモーター領域をコードする遺伝子に関する。

(1) 配列表の配列番号：1に示す塩基配列を有するp51プロモーター領域をコードするDNA；

(2) 配列表の配列番号：1に示す塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつp51プロモーター能を有するDNA；

(3) 配列表の配列番号：1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつp51プロモーター能を有す

るDNA；

- (4) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列を有する、p51プロモーター領域及びp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードするDNA；
- (5) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列において1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつp51プロモーター能を有するDNA；
- (6) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつp51プロモーター能を有するDNA。

更に、本発明は、以下の(7)、(8)又は(9)に示すp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードする遺伝子に関する。

- (7) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5677番目から5960番目の塩基配列を有するDNA；
- (8) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5677番目から5960番目の塩基配列において1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつ上記(7)のDNAと同様の機能を有するDNA；
- (9) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5677番目から5960番目の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ上記(7)のDNAと同様の機能を有するDNA。

#### 【0007】

更に、本発明は、上記(1)から(6)の遺伝子を含むことを特徴とする組換え体プラスミドに関する。

更に、本発明は、上記組換え体プラスミドを含む形質転換体又は形質導入体に関する。

更に、本発明は、上記(1)から(9)の遺伝子の塩基配列の全体又は部分からなる核酸プローブに関する。

更に、本発明は、上記核酸プローブを用いたハイブリダイゼーションによるp5



1プロモーターニング方法に関する。

更に、本発明は、上記(1)から(9)の遺伝子の全体又は部分に対してアンチセンスであり、p51プロモーター能の機能を修飾可能なDNA配列に関する。

更に、本発明は、上記(1)から(9)の遺伝子の全体又は部分に対してアンチセンスであり、p51プロモーター能の機能を修飾可能なRNA配列に関する。

更に、本発明は、上記形質転換体又は上記形質導入体を用いたp51プロモーターに作用する薬剤のスクリーニング方法に関する。

更に、本発明は、上記スクリーニング方法により選択された、p51遺伝子の発現を上昇あるいは阻害する化合物に関する。

更に、本発明は、上記DNA又は上記RNAを含む医薬製剤に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

以下本発明をより具体的に説明する。

(1) 本発明のp51プロモーター領域を有する遺伝子

(1-1) 本発明のp51プロモーター領域を有する遺伝子を単離するためには、ヒトゲノムDNAライブラリを作製し、このライブラリの中から、前記Nature Medicine誌の文献記載の配列の一部を利用し、p51mRNAの5ダッシュ末端側非翻訳領域と相補的なcDNAとハイブリダイズするcDNA分子を単離、クローニングして、p51プロモーター領域をコードする遺伝子を単離する事ができる。

【0009】

本発明のp51プロモーター領域を有する遺伝子の塩基配列は、配列表の配列番号1に示したとおりである。この遺伝子配列において、TATAボックスが同配列表の第5630番目から第5636番目の塩基間と、第5659番目から第5665番目までの塩基間にコードされている。これは、p51A蛋白質のmRNA (p51AmRNA)の配列として報告されている遺伝子配列の上流47ベースと18ベースの位置に存在する。さらに、筋肉細胞特異的転写因子であることが知られているMEF2の結合部位が、同配列表の第1211番目から第1220番目の塩基間に存在する。また、配列表の配列番号1に示したp51プロモーター領域をコードする遺伝子とホモロジーを有する遺伝子をデータベースにより検索したが、全長に渡り30

%以上のホモロジーを有するものは存在しなかった。

【0010】

更に、配列表の配列番号1に示される塩基配列を有する遺伝子の機能を確認する目的で、以後の実施例に示すように、配列表の配列番号1に示される塩基配列を有する遺伝子とルシフェラーゼレポーター遺伝子を接続したプラスミドを構築し、ヒト培養細胞株中で発現させた形質転換体を作製した。この形質転換体はコントロール群に比べて有意にルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現を示した。さらに1  $\mu\text{g/ml}$ のトリコスタチンA（和光純薬社製）によってp51がヒト培養細胞株中で転写活性化されることを見出し、この条件下において、単離したp51プロモーター領域を有する遺伝子のプロモーター活性がさらに著しく上昇することを確認した。これらの結果より、配列表の配列番号1に示した塩基配列を有する遺伝子が、p51プロモーターとしての機能を有することを明らかにした。

【0011】

(1-2) 配列表の配列番号：1に示す塩基配列において、1もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつp51プロモーター活性を有するDNAも本発明の範囲内のものである。塩基の欠失、置換もしくは付加は、実質的にそのプロモーター全体の構造および機能に影響を与えない程度のものである。これらの塩基の欠失、置換もしくは付加の程度は、p51プロモーター活性を有し、もとの塩基配列との相同性が80%以上、好ましくは90%以上のものが許容し得る。

【0012】

(1-3) 配列表の配列番号：1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつp51プロモーター活性を有するDNAも本発明の範囲内のものである。このようなハイブリダイズするDNA変異体としては、部位特異的変異導入、変異剤処理によるランダム変異、制限酵素切断によるDNA断片の変異、欠失、連結等により部分的にDNA配列が変化したものが挙げられる。これらのDNA変異体が配列番号1に示すコード遺伝子とハイブリダイズする程度としては、ストリンジェントな条件下、例えば、ハイブリダイゼーション溶液（50 mM トリス-塩酸（pH 7.5）、1 M 塩化ナトリウム、1 % ドデシル硫酸ナ

トリウム、10%デキストラン硫酸、0.2mg/ml酵母RNA、0.2mg/ml サケ精子DNA) 中で上記メンブランを65℃にて、1時間保温し、プレハイブリダイゼーションとし、次に、放射性同位体標識した cDNA断片を放射性同位体量にして100万dpm/mlとなるように添加し、65℃にて、16時間保温することにより、ハイブリダイゼーションを行い、続いて、このメンブランを、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む2×SSC溶液(300mM塩化ナトリウム、30mMクエン酸三ナトリウム) 中で、65℃にて、30分間洗浄した後、オートラジオグラフィで解析した際にX線フィルム上でハイブリダイズが確認されるものである。

## 【0013】

(1-4) 配列表の配列番号: 2 に示される、p51のプロモーター領域及びp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードするDNAも本発明の範囲内のものである。配列番号: 2における5677番目から5960番目の塩基配列が5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードするDNAに相当する。その内で5767番目から5960番目の塩基配列がイントロン領域に相当する。

(1-5) 配列表の配列番号: 2に示す塩基配列において、1もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつp51プロモーター活性を有するDNA も本発明の範囲内のものである。塩基の欠失、置換もしくは付加は、実質的にそのプロモーター全体の構造および機能に影響を与えない程度のものである。これらの塩基の欠失、置換もしくは付加の程度は、p51プロモーター活性を有し、もとの塩基配列との相同性が80%以上、好ましくは90%以上のものが許容し得る。

## 【0014】

(1-6) 配列表の配列番号: 2に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつp51プロモーター能を有するDNAも本発明の範囲内のものである。このようなハイブリダイズするDNA変異体としては、上記(1-3)において例示したと同様のものが挙げられる。これらのDNA変異体が配列番号2に示す遺伝子とハイブリダイズする程度としては、上記(1-3)において記載したと同様のストリンジェントな条件で同様にハイブリダイズが確認されるものである。

【0015】

(2) 本発明のp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードする遺伝子

(2-1) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5677番目から5960番目の塩基配列を有するDNAは、p51のプロモーター領域の下流に位置する、p51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードするDNAであり、かかるDNAも本発明の範囲内のものである。その内で5767番目から5960番目の塩基配列がイントロン領域に相当する。p51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードするDNAは、以後に述べるように、例えば、その一部又は全部を遺伝子のクローニングのための核酸プローブとして利用することができる。

【0016】

(2-2) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5677番目から5960番目の塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列を有し、かつ上記(2-1)のDNAと同様の機能を有するDNAも本発明も範囲内のものである。塩基の欠失、置換もしくは付加は、実質的にそのDNAの構造および機能に影響を与えない程度のものである。これらの塩基の欠失、置換もしくは付加の程度は、上記(2-1)のDNAと同様の機能を有し、もとの塩基配列との相同性が80%以上、好ましくは90%以上のものが許容し得る。

【0017】

(2-3) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5677番目から5960番目の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ上記(2-1)のDNAと同様の機能を有するDNAも本発明の範囲内のものである。このようなハイブリダイズするDNA変異体としては上記(1-3)において例示したと同様のものが挙げられる。これらのDNA変異体が配列番号2に示す遺伝子とハイブリダイズする程度としては、上記(1-3)において記載したと同様のストリンジェントな条件で同様にハイブリダイズが確認されるものである。

【0018】

(3) 本発明のp51プロモーター領域を有する遺伝子を含む組換え体プラス

ミド

本発明のp51プロモーター領域を有する遺伝子を含む組換え体プラスミドを構築することで、該遺伝子が大腸菌などに安定に保持させることが可能であり、この際ベクターとしては、一般に使われるものはすべて使用可能であるが、例えば、pBluescript II SK(-)等がある。以後に述べる実施例では、p51プロモーター領域を有する遺伝子をpBluescript II SK(-)に組み込んだpBS/p51 promoterが例示されている。これらプラスミドを必要に応じて適当な制限酵素等で切断した後、適当なベクターに接続し、プロモーター活性測定用プラスミドとすることが出来る。プロモーター活性測定用プラスミドとしてはpGL2等のプラスミドをベクターとして使用すればよい。

## 【0019】

(4) 形質転換体又は形質導入体

上記の組換え体プラスミドを、適当な宿主に導入して形質転換体または形質導入体を構築することが出来る。大腸菌、酵母、哺乳類細胞が使用可能である。プロモーター活性測定用プラスミドを保持する形質転換体は、上記のように活性測定用ベクターに組み込んだ組換え体プラスミドを適当な宿主に形質転換することにより得られる。例えば、図1に示すような組換え体プラスミドを哺乳類培養細胞に導入して形質転換体を得られる。形質転換体又は形質導入体は適当な栄養培地で培養し、その細胞中のレポーター遺伝子の発現量を測定することによってプロモーター活性を測定することが出来る。

## 【0020】

(5) 核酸プローブ、それを用いた遺伝子のクローニング及び検出

本発明では上記のようにして得られた本発明のp51プロモーター領域を有する遺伝子の一部又は全部、あるいは本発明のp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードする遺伝子の一部又は全部を、以下に述べるような遺伝子のクローニングなどに用いるための核酸プローブとして利用できる。本発明遺伝子の一部からなる核酸プローブとしては、15ヌクレオチド以上のオリゴヌクレオチドからなる核酸プローブが挙げられる。該核酸プローブは、上記本発明遺伝子又はその遺伝子断片を適当なベクターに接続し、細菌に導入し、複製させ、菌体破碎液からフ

エノールなどにより抽出、そしてベクターと接続した部位を認識する制限酵素で切断、電気泳動後、ゲルより切り出せば調製できる。また、該核酸プローブは、配列表の配列番号 1 又は 2 の塩基配列に基づき、DNA合成機による化学合成や、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション（PCR）法による遺伝子増幅技術によっても調製できる。該核酸プローブは使用時の検出感度を上げるために放射性同位体や、蛍光で標識することもできる。

## 【0021】

該核酸プローブは、プロモーター能を有する上記以外の遺伝子のクローニング方法、ならびにその下流の蛋白質をコードする遺伝子のクローニング方法に用いることができる。即ち、該核酸プローブを用いて、ハイブリダイゼーション法、又は、PCR法により、各種の生物組織のゲノムライブラリーを探索すれば、本発明遺伝子と同様の機能を有する遺伝子、または、その下流に存在する蛋白質をコードする遺伝子を単離することができる。

## 【0022】

## (6) アンチセンスDNA及びアンチセンスRNA

本発明では、上記のp51プロモーター領域を有する遺伝子のアンチセンスDNA及びアンチセンスRNA、並びにp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域を有する遺伝子のアンチセンスDNA及びアンチセンスRNAも提供される。これらのアンチセンスDNA及びアンチセンスRNAを細胞に導入することにより、p51をコードする遺伝子の発現を抑制すること又は上昇せしむることが可能である。導入するアンチセンスDNAとしては、例えば配列表の配列番号 1 又は 2 の対応するアンチセンスDNA又はその一部を用いることができる。該アンチセンスDNAの例を配列表の配列番号 3 に示す。これは、配列表の配列番号 1 のp51プロモーター能を有する遺伝子のアンチセンスDNAの配列を示すものである。アンチセンスDNAとしては、例えば、これらのアンチセンスDNAの一部を適当に切断して得た断片を用いても良いし、これらのアンチセンスDNA配列に基づいて合成したDNAを用いても良い。

## 【0023】

アンチセンスRNAとしては、例えば配列表の配列番号 1 又は 2 の対応するアンチセンスRNA又はその一部を用いることができる。該アンチセンスRNAの例を配列

表の配列番号4に示す。これは、配列表の配列番号1のp51プロモーター能を有する遺伝子のアンチセンスRNAの配列を示すものである。アンチセンスRNAとしては、例えば、これらのアンチセンスRNAの一部を適当に切断して得た断片を用いても良いし、これらのアンチセンスRNA配列に基づいて合成したRNAを用いても良い。また、例えば配列表の配列番号1のp51プロモーター能を有する遺伝子又はその一部を適当なベクターに接続し、細菌に導入し、複製させ、菌体破碎液からフェノールなどにより抽出したものを鋳型として、イン・ビトロ転写系でRNAポリメラーゼを作用させて作製したRNAを用いても良い。アンチセンスDNA及びアンチセンスRNAは生体内で分解されにくい様に、更に、細胞膜を通過できるように化学的な修飾を施しておくことができる。このようにして調製したアンチセンスDNA及びアンチセンスRNAは、悪性腫瘍をはじめとする各種疾患の治療に使用することができる。

#### 【0024】

##### (7) 薬剤のスクリーニング

本発明では、本発明の形質転換体又は形質導入体を用いた新規薬剤のスクリーニング方法が提供される。例えば、ルシフェラーゼレポーター遺伝子と該遺伝子を接続した組換え体プラスミドを導入した培養細胞を用い、ルシフェラーゼ活性を上昇させる薬剤をスクリーニングすることによって、p51 蛋白質の発現を上昇させる物質を見出すことができる。

#### 【0025】

##### (8) 医薬製剤

p51は筋肉細胞等非常に限局した組織にのみ発現が認められる。従って、本発明のp51プロモーター能を有する遺伝子の下流に目的の遺伝子を接続し、特異的組織のみで目的遺伝子を発現させることにより遺伝子治療ベクターとして用い得る。また、上記したアンチセンスDNA、アンチセンスRNAは悪性腫瘍をはじめとする各種疾患の治療薬剤となりうる。

#### 【0026】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限

定されるものではない。

【0027】

#### 実施例 1

##### p51プロモーター領域をコードする新規遺伝子断片の単離

##### (1-1) スクリーニング用プローブの調製

p51プロモーター領域をコードする新規遺伝子断片のスクリーニング用プローブを調製した。その方法として、RT-PCR法を用いた。以下に実験手順を示す。ヒト筋肉由来RNA (OriGene社製) 6  $\mu$ g を逆転写酵素Superscript (GIBCO BRL 社製) 200ユニットを用いてcDNAとした。続いて、これを鋳型として、配列番号5、6に示されるプライマーセット、並びに配列表の配列番号7、8に示されるプライマーセットを用い、PCR法にてp51mRNA由来遺伝子断片の増幅を試みた。前者のプライマーセットを用いて増幅される遺伝子は、現在までに報告されているp51AmRNAの5'ダッシュ末端非翻訳領域143ベースならびにオープンリーディングフレームの5'ダッシュ末端側165ベースをコードし、後者のプライマーセットを用いて増幅される遺伝子はp51AmRNAオープンリーディングフレーム全長をコードする。前者の遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号9に示す。PCR法を実施するにあたり、DNAポリメラーゼはEX Taq (宝酒造社製) を用い、PCR条件は95℃ (1分)、55℃ (1分)、72℃ (1分) を1サイクルとし、30サイクル増幅した。PCR増幅産物はフェノール処理、クロロホルム処理による除蛋白質後、エタノール沈殿した。続いて、このDNAを70%エタノールで洗浄し、滅菌水に溶解した。次に、これらの精製DNAと、20ngの大腸菌用ベクターpBluescript KS(+) (東洋紡社製) を制限酵素EcoRV (宝酒造社製) で切断後、その切断末端にチミンを一つ付加したDNA (以下pBS/EcoRV TAと表記する) とをDNAライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて接続した (以下、配列番号5、6に示されるプライマーセットにより得られる増幅遺伝子を含むプラスミドをpBS/p51-1、配列番号7、8に示されるプライマーセットにより得られる増幅遺伝子を含むプラスミドをpBS/p51A ORFと記載する)。なお、増幅遺伝子に突然変異のないことを、pBS/p51-1、pBS/p51A ORFの塩基配列を決定することにより確認した。塩基配列の決定は、自動シーケンサーLONG READIR4200 (ライカ社製) を用い



で行った。続いて、pBS/ p51-1を、制限酵素EcoRV並びにPstI（東洋紡社製）で切断後、0.8%アガロース電気泳動により分画し、抽出、精製した。精製にはEASYTRAP（宝酒造社製）を用いた。この精製DNA をスクリーニング用プローブの鋳型として用いることとした。

【0028】

(1-2) p51プロモーター領域をコードする新規遺伝子断片のスクリーニング

続いて、ヒトゲノムライブラリより、p51 プロモーター領域をコードする遺伝子断片のスクリーニングを試みた。ヒトゲノムライブラリとして、Easy-to-Handle Eukaryotic Genomic Library from human (Mo Bi Tec 社製)を用いた。このライブラリの感染効率は1  $\mu$ lあたり300万プラークフォーミングユニットであった。このライブラリを用いて、プラークハイブリダイゼーション用のメンブランを以下の方法に従って調製した。0.02  $\mu$ lのライブラリ溶液と、0.9mlのC600大腸菌溶液（大腸菌株C600を0.2%マルトース、10mM硫酸マグネシウムを含むLB培地（0.5%イーストエキストラクト、1%ペプトン、0.5%塩化ナトリウム）50ml中にて、37℃にて、16時間振盪培養し、5000回転、5分間の遠心にて回収後、25mlの10mM硫酸マグネシウムに懸濁したもの）を混合し、37℃にて、15分間保温し、ファージを感染させた。ここに、融解後47℃にて、保温した7mlのLBソフトアガー（0.5%イーストエキストラクト、1%ペプトン、0.5%塩化ナトリウム、10mM硫酸マグネシウムに0.7%寒天を加え寒天培地としたもの）を加え、穏やかに混和後、各直径150mmのLB?硫酸マグネシウムプレート（0.5%イーストエキストラクト、1%ペプトン、0.5%塩化ナトリウム、10mM硫酸マグネシウムに1.5%寒天を加えて寒天培地としたもの）に散布した。この操作により、一枚のプレートあたり6万個のプラークが出現した。同様の手順で計23枚のプレートに散布を行った。これらを37℃にて、16時間培養し、プラークを形成させた。次に、このプレートを4℃にて、1時間冷却した後、ナイロンメンブラン、コロニープラークスクリーン（NEN社製）にプラークを接着させた。このメンブランを乾燥後、500mMのアルカリ液（0.2N 水酸化ナトリウム、1.5M塩化ナトリウム）中で、室

温にて2分間変性し、続いて500mlの中和液(0.5M トリシュー塩酸(pH7.2)、1.5M 塩化ナトリウム、1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム)中で、室温にて2分間中和した。次に、このメンブランを3×SSC溶液(450mM塩化ナトリウム、45mMクエン酸三ナトリウム)中、55℃にて、1時間保温した後、乾燥し、ブランクハイブリダイゼーション用メンブランとした。pBS/p51-1を、制限酵素EcoRV並びにPstIで切断、精製した前述のcDNA断片50ngをPrime-It II (ストラタジーン社製)を用いて放射性同位体標識し、スクリーニング用プローブとした。

## 【0029】

次に、このメンブランを用いてブランクハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション溶液(50mMトリシュー塩酸(pH7.5)、1M 塩化ナトリウム、1%ドデシル硫酸ナトリウム、10%デキストラン硫酸、0.2mg/ml酵母RNA、0.2mg/ml サケ精子DNA)50ml中で上記メンブランを65℃にて、1時間保温し、プレハイブリダイゼーションとした。次に、放射性同位体標識したcDNA断片を放射性同位体量にして100万dpm/mlとなるように添加し、65℃にて、16時間保温することにより、ハイブリダイゼーションを行った。続いて、このメンブランを、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む2×SSC溶液(300mM塩化ナトリウム、30mMクエン酸三ナトリウム)中で、65℃にて、30分間洗浄した。この洗浄は二度行った。続いて、これらメンブランのオートラジオグラフィを行うことによって、陽性を示すブランクを検出した。

## 【0030】

次に、陽性シグナルに対応するブランクを含むブランク群を単離し、1mlのSM緩衝液(50mMトリシュー塩酸(pH7.5)、100mM塩化ナトリウム、10mM硫酸マグネシウム、0.01%ゼラチン)に懸濁した。この溶液は4℃にて、16時間保温し、ファージを溶出した後、13000回転、10分間の遠心により、上清にファージを回収した。このファージ溶液を上記と同様の方法でLB?硫酸マグネシウムプレートに散布し、陽性ブランクをスクリーニングした。この結果、完全に単離されたブランクとして陽性ブランクを単離する事に成功した。このブランクより上記と同様の方法でファージを単離した。

## 【0031】

次に、このファージに含まれるライブラリDNAの塩基配列を決定する目的で以下の実験を行った。このライブラリはラムダPSファージを用いて作成されている(Mo Bi Tec社製)。このファージはその塩基配列中にloxPの組み換えサイトを有しており、Creリコンビナーゼを有する大腸菌BNN132株中に導入することによって、ファージからゲノムライブラリ配列を含むベクター部分を切り出すことが出来る。この操作を以下の方法に従って行った。20  $\mu$ lのファージ溶液を、200  $\mu$ lのBNN132大腸菌液(大腸菌株BNN132を0.2%マルトース、10 mM硫酸マグネシウムを含むLB培地50 ml中にて、37℃にて、16時間振盪培養し、5000回転、5分間の遠心にて回収後、25 mlの10 mM硫酸マグネシウムに懸濁したもの)と混和し、37℃で30分間保温した。続いて、この混合液をLB?アンピシリンプレート(0.5%イーストエキストラクト、1%ペプトン、0.5%塩化ナトリウム、0.1 mg/mlアンピシリンナトリウムに1.5%寒天を加えて寒天培地としたもの)に散布し、出現したコロニーより目的のプラスミドを調製した。プラスミドの調製は、ラボマニュアル遺伝子工学(丸善刊、村松正實編、1990年)53-55頁の手順に従って行った。このプラスミド中には約15キロベースのライブラリ遺伝子が含まれていることが明らかとなった。以下pPS/libraryと表記する。

## 【0032】

(1-3) p51プロモーター領域をコードする遺伝子断片の配列決定

次に、pPS/library中のライブラリ遺伝子の塩基配列を一部、自動シーケンサーLONG READIR4200を用いて決定し、p51A mRNAを相補するcDNA配列の一部を含むことを確認した。また、その結果、pPS/libraryを制限酵素EcoRVで切断したときに生じる0.6キロベースの遺伝子断片にp51A mRNAを相補するcDNA配列の一部が含まれることが明らかになった。続いて、pPS/libraryを制限酵素PvuII(東洋紡社製)で切断し、0.8%アガロース電気泳動で分画後、ナイロンメンブレン、HybondN+(アマシャム社製)にブロッティングした。プラスミド断片のブロッティングは、ラボマニュアルヒトゲノムマッピング(丸善刊、堀雅明、中村祐輔編、1991年)26-36頁の手順に従って行った。このメンブランを

用いて以下の手順でサザンブロッティングを行った。プローブ用cDNA断片として pPS/library を制限酵素EcoRV を用いて切断し、0.8%アガロース電気泳動で分画後、0.6キロベースの遺伝子断片を切り出し、EASYTRAPにて精製した。この精製cDNAをPrime-It IIを用いて放射性同位体標識し、プローブとした。メンブランはサザンブロッティング用ハイブリダイゼーション溶液（10%ドデシル硫酸ナトリウム、7%PEG 8000）中で65℃にて、1時間保温し、プレハイブリダイゼーションとした。続いて、前述のプローブを放射性同位体量にして100万dpm/mlとなるように添加し、65℃にて、16時間保温することにより、ハイブリダイゼーションを行った。続いて、このメンブランを、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む2×SSC溶液中で、65℃にて、30分間洗浄した。この洗浄は二度行った。続いて、これらメンブランのオートラジオグラフィーを行うことによってp51 mRNAの直上流域を含むPvuII切断断片が5.5キロベースの長さであることを明らかにした。続いて、pPS/library を制限酵素PvuIIを用いて切断し、0.8%アガロース電気泳動で分画後、5.5キロベースの遺伝子断片を切り出し、EASYTRAPにて精製した。この精製cDNA断片を、pBluescript II SK(+)を制限酵素EcoRV で切断後エピアルカリホスファターゼで脱リン酸化したものと、DNAライゲーションキットを用いて接続した。このプラスミドを以後、pBS/PvuII 5.5と表記する。この塩基配列を自動シーケンサーLONG READIR 4200を用いて決定した。この塩基配列と、上記で決定した pPS/libraryの部分塩基配列を総合し、配列表の配列番号2に示す塩基配列を得た。また、配列表の配列番号2に示される塩基配列から、p51の5ダッシュ側非翻訳領域をコードする部分を取り除いた塩基配列を配列表の配列番号1に示した。また、このPvuII切断断片の3ダッシュ末端は、p51 mRNAに対応するcDNA配列である配列表の配列番号9の第1番目の塩基の約0.22キロベース上流に存在することが明らかとなった。

## 【0033】

そこで、報告されているp51 mRNAの一部に対応するcDNAである配列表の配列番号9の第1番目の塩基までを含むプラスミドを調製することを目的として以下の操作を行った。pPS/libraryを制限酵素EcoRV を用いて切断し、0.8%アガロース電気泳動で分画後、0.6キロベースの遺伝子断片を切り出し、EASYTRAPにて

精製したものと、pBS/PvuII5.5を制限酵素EcoRV 並びに制限酵素SmaI（宝酒造社製）で切断し、エピアルカリホスファターゼで脱リン酸化したものと、DNAライゲーションキットを用いて接続した。得られたプラスミドを解析し、正しい方向に接続されているプラスミドを単離した。以下、このプラスミドをpBS/p51 promoterと記載する。

#### 【0034】

また、この塩基配列がゲノム上に確実に存在することを証明する目的で、以下の実験を行った。大腸癌細胞株HCT 116株よりゲノムDNAを調製し、これを鋳型にPCRを行った。ゲノムDNAは細胞工学実験プロトコル（秀潤社刊、東京大学医科学研究所制癌研究部編、1993年）16-19頁に準じて調製した。プライマーは配列番号10と11に示したものをを用いた。これは、それぞれ、配列表の配列番号1の塩基配列の第3543番目から第3570番目の塩基のセンス鎖、第5458番目から第5487番目のアンチセンス鎖に相当する。ポリメラーゼはLA Taq（宝酒造社製）、PCRは94℃（1分）、68℃（3分）を1サイクルとして30サイクル増幅した。このPCR産物を0.8%アガロース電気泳動し、1.9キロベースの遺伝子断片が特異的に増幅されることを確認した。さらに、この断片を切り出した後、EASYTRAPにより精製し、pBS/EcoRV TAとDNAライゲーションキットを用いて接続した。このプラスミドの塩基配列を自動シーケンサーLONG READIR 4200を用いて決定し、pBS/p51 promoter中の塩基配列と完全に一致することを確認した。

#### 【0035】

##### （1-4）p51プロモーター領域を含むルシフェラーゼベクターの構築

単離した領域にプロモーター活性が存在することを確認する目的で、この遺伝子配列をルシフェラーゼレポーター遺伝子上流に接続したベクターを以下の方法に従って調製した。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を有するベクターとして、pGL2（プロメガ社製）を用いた。まず、哺乳類細胞中にpGL2を組み込み、選択することが可能となるように、このベクターにネオマイシン耐性遺伝子を導入することとした。pGL2を制限酵素BamHI（東洋紡社製）で切断したものと、pMAM neo（東洋紡社製）をBamHI で切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動で分画後、

2617ベースのネオマイシン耐性遺伝子を切り出し、EASYTRAPで精製したものとDNAライゲーションキットを用いて接続した。このプラスミドを以下、pGL2-neoと表記する。続いて、pGL2-neoを制限酵素XhoI（東洋紡社製）で切断後、エタノール沈殿し、さらに70%エタノールで洗浄後、精製水に溶解した。このDNAを、DNA ブランディングキット（宝酒造社製）を用いて切断末端を平滑化した後、エタノール沈殿し、70%エタノールで洗浄後、精製水に溶解した。続いて、このDNA を制限酵素KpnI（ベーリンガーマンハイム社製）で切断後、フェノール処理、クロロホルム処理による除蛋白を行い、エタノール沈殿、さらに70%エタノールで洗浄後、滅菌水に溶解した。このDNAをpGL2-neo/XhoI(blunting), KpnIと表記する。

## 【0036】

次に、pBS/p51promoter を制限酵素NotI（ベーリンガーマンハイム社製）で切断後、エタノール沈殿し、さらに70%エタノールで洗浄後、精製水に溶解した。このDNAを、DNA ブランディングキット（宝酒造社製）を用いて切断末端を平滑化した後、エタノール沈殿し、70%エタノールで洗浄後、精製水に溶解した。続いて、このDNA を制限酵素KpnI（ベーリンガーマンハイム社製）で切断後、0.8%アガロース電気泳動で分画し、5.7キロベースの遺伝子断片を切り出し、EASYTRAPにより精製した。この遺伝子断片をpBS/p51promoter/NotI(blunting), KpnI5.7と表記する。続いて、pGL2-neo/XhoI(blunting), KpnIとpBS/p51promoter/NotI(blunting), KpnI5.7をDNAライゲーションキットを用いて接続した。このプラスミドをpGL2-neo/p51promoterと表記する。また、このプラスミドの遺伝子配列を配列表の配列番号の12に示す。さらに、このプラスミドの制限酵素地図を図1に示す。

## 【0037】

(1-5) p51の転写量に対する各種薬剤等の効果1) ノーザンハイブリダイゼーション

大腸癌由来細胞株HCT 116に薬剤刺激を始めとする様々な刺激を与え、p51の発現量の変化をノーザンブロッティングによって検討した。20万個のHCT 116細胞株を直径60mmの培養ディッシュに散布し、5%二酸化炭素の存在下、

37℃にて、2日間培養した。メディウムはMcCoy's 5A（日生研社製）に最終濃度が10%となるようにウシ血清（FBS: fetal bovine serum）を添加したもの（以下McCoy's 5A/10%FBSと表記する）を用いた。続いて、A23187（0.1  $\mu$ M、1  $\mu$ M）、シスプラチン（1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml）、CPTcAMP（0.1  $\mu$ M、1  $\mu$ M）、エトポシド（10 ng/ml、0.1  $\mu$ g/ml）、ジェニステイン（1  $\mu$ M、10  $\mu$ M）、ML-236B（1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml）、ミルリノン（1  $\mu$ M、10  $\mu$ M）、マイトマイシンC（5  $\mu$ g/ml、50  $\mu$ g/ml）、NKH477（0.1  $\mu$ M、1  $\mu$ M）、オカダ酸（1 nM、10 nM）、ラディシコール（0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml）、スタウロスポリン（1 nM、10 nM）、タキソール（1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml）、トリコスタチンA（0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml）、放射線照射（一平方メートルあたり50J、100J）、ビタミンD3（10 nM、100 nM）、ビンクリスチン（1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml）、ワートマニン（0.1  $\mu$ M、1  $\mu$ M）を処理し、5%二酸化炭素の存在下、37℃にて、24時間さらに培養した。続いて、この細胞より、ISOGEN（ニッポンジーン社製）を用いてRNAを調製した。RNAは各20  $\mu$ gをホルムアルデヒドを含む1%アガロース電気泳動にて分画し、前記の新細胞工学実験プロトコル194-197頁の方法に従ってナイロンメンブランHybondN+にブロッティングした。プローブとして、pBS/p51AORFを制限酵素EcoRI（東洋紡社製）で切断し、0.8%アガロース電気泳動で分画後、0.6キロベースの遺伝子断片を切り出し、EASYTRAPにより精製したものを、Prime-It IIにて放射性同位体標識したものをを用いた。メンブランを10mlのプレハイブリダイゼーション溶液（25 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）、6×SSC、50%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、0.2 mg/mlサケ精子DNA）中で42℃にて、4時間保温し、プレハイブリダイゼーションとした。続いて、10mlのハイブリダイゼーション溶液（20 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）、6×SSC、50%ホルムアミド、1×デンハルト溶液、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、0.1 mg/mlサケ精子DNA、4%デキストラン硫酸）に置換した後、放射性同位体標識した上記プローブを100万dpm/mlになるように添加し、さらに42℃にて、16時間保温することにより、ハイブリダイゼーションを行った。次にこれを、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む2×SSC中で、65℃にて、30分間洗

浄した。この洗浄は二度行った。このメンブランをオートラジオグラフィーにより解析した。

【0038】

## 2) 結果

この結果、 $1 \mu\text{g/ml}$ のトリコスタチンA処理細胞にのみp51A由来のcDNAと反応する特異的なバンドが認められた。その他のいずれの刺激においてもp51mRNA量の増加は認められなかった。図2に、トリコスタチン処理によるp51mRNAの上昇を示す。なお、図2においては、レーン1、2：タキソール ( $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ ) 処理細胞、レーン3、4：トリコスタチンA ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$ )、レーン5、6：放射線照射 (一平方メートル当たり50J、100J) 処理細胞、レーン7、8：ビタミンD3 ( $10 \text{nM}$ 、 $100 \text{nM}$ ) 処理細胞、レーン9、10：ビンクリスチン ( $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ ) 処理細胞、レーン11、12：ワートマニン ( $0.1 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ ) 処理細胞のRNA  $20 \mu\text{g}$ のプロットを示した。

【0039】

## (1-6) p51 プロモーター領域の機能解析

引き続いて、p51 プロモーター領域の機能解析を行う目的で以下の実験を行った。20万個のHCT116細胞を直径60mmの培養ディッシュに散布した。メディウムはMcCoy's 5A/10%FBSを用いた。これらを、5%二酸化炭素の存在下、 $37^\circ\text{C}$ にて、48時間培養した後、メディウムを血清を含まないMcCoy's 5Aに置換した。続いて、pGL2-neo/p51promoter又は、pGL2-neoベクター各 $2 \mu\text{g}$ を導入した。プラスミドの導入は、リポフェクトアミンプラス試薬 (GIBCO BRL社製) を用いて行った。すなわち、プラスミド溶液に $125 \mu\text{l}$ のMcCoy's 5Aと、 $8 \mu\text{l}$ のプラス溶液を加え、良く攪拌した後、室温にて15分間保温した。ここに、 $125 \mu\text{l}$ のMcCoy's 5Aと $12 \mu\text{l}$ のリポフェクタミン溶液を添加し、良く攪拌した後、室温にて、さらに15分間保温した。これを上記の手順で培養したHCT116細胞に投与し、穏やかに混和後、5%二酸化炭素の存在下、 $37^\circ\text{C}$ にて、3時間培養しプラスミドを取り込ませた。続いてメディウムをMcCoy's 5A/10%FBSに置換し、5%二酸化炭素の存在下、 $37^\circ\text{C}$ にて、21時間培養した。引き続いて、この二群の細胞にトリコスタチンAを最終濃度0又は $1 \mu\text{g/ml}$ になる



ように投与し、5%二酸化炭素の存在下、37℃にて、24時間培養した。これらの細胞について、そのルシフェラーゼ活性を測定することによって、プロモーター活性の検討を行った。また、ルシフェラーゼ遺伝子を含まないネガティブコントロール細胞として、pcDNA3/lacZ (lacZ遺伝子を哺乳類細胞発現ベクターpcDNA3に接続したもの)を上記と同じ手順でトランスフェクションしたものを準備した。ルシフェラーゼ活性測定は以下の方法に従って行った。

## 【0040】

細胞培養ディッシュ中のメディウムを除去し、5mlの細胞溶解試薬(25mM トリス塩酸(pH7.8)、2mMジチオトレイトール、2mM CDTA、0.2% トライトンX-100、10%グリセロール)を添加した後、室温にて15分間保温した。この細胞溶解液を10、20、30、40、50 $\mu$ lずつ分取し、基質液(20mM トリシン-水酸化ナトリウム(pH7.8)、1.07mM塩基性炭酸マグネシウム、2.67mM硫酸マグネシウム、0.1mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、33.3mMジチオトレイトール、270 $\mu$ M コエンザイムA、470 $\mu$ M ルシフェリン、530 $\mu$ M アデノシン三リン酸)50 $\mu$ lを添加し、室温にて15秒保温した後、ルミノメーターLUMINOSKAN(大日本製薬社製)にてその化学発光強度を測定した。これらの結果を図3に示す。

## 【0041】

これらの結果より、pGL2-neo/p51promoter導入細胞溶解液はpGL2-neoに比べて有意に高い蛍光強度を示すことがわかった。また、トリコスタチンAの投与によってpGL2-neo/p51promoter中の化学発光強度はさらに著しく増強された。この結果は、前述の図2の結果と一致するものである。

## 【0042】

上記の実験データから、単離した遺伝子断片が機能的なp51プロモーター領域であることが明らかとなった。

## 【0043】

## 【発明の効果】

本発明により、細胞死誘導能を示す蛋白質p51のプロモーター領域をコードする遺伝子、並びにp51の5'ダッシュ非翻訳領域をコードする遺伝子が提供される

。これらは、細胞増殖制御の異常で起こる癌を始めとする疾患の診断、治療に有用である。さらに本発明により、これら遺伝子のアンチセンスDNA及びアンチセンスRNA、これら遺伝子の一部又は全部からなる核酸プローブ、その核酸プローブを用いた上記本発明遺伝子あるいはその類似遺伝子の検出方法、上記本発明遺伝子を導入させた形質転換体、これらを用いた薬剤のスクリーニング法などが提供される。これら遺伝子は癌等の疾患の診断、治療にも有用である。

【0044】

【配列表フリーテキスト】

配列表の配列番号：5から8，10及び11の塩基配列は、PCRプライマーを示す。

配列番号：9の塩基配列は、p51 mRNAの5ダッシュ末端非翻訳領域及びp51 mRNAのオープンリーディングフレームの5ダッシュ末端側165ベースをコードする。

配列番号：12の塩基配列は、p51のプロモーター及びネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドのDNA配列を示す。

【0045】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Gene Encoding Promoter Region of Tumor Suppressor Gene p51

<DA-02792>

<160> 12

<210> 1

<211> 5 6 7 6

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cagctgttca gggatgtctg gaaaagaagc ccaccacat tgcttctgga cactgggtgt	60
gactttggag ggtatcaggt ttgtctgtta aagaaactgc caacctcttc ctgcccgaat	120
tggcctctgt tcccttgcac gccctcttcc cttgggacac tcccttaagg catcttcttg	180
acattaactt aactataaat gtttatttga tgaatttcag tgacctgaag agagatggag	240
gtcaaatcag aagaagcaca tggctaaggt tgcaatgcac ttgctttttc attgaattaa	300
agtcattcga ataccattca gtttacttaa gttctaggcc cagctttact cctaactgat	360
gtcagactgt agcaaataat aggtccaaag ttggaagagt tagcaggatc ctctccatga	420
cagaactttg gcttccactt tactaaaata gagatttgtt ggttgagctg cagctatgta	480
cagaaaagtg tcatacaatt aaaaatcacc aaactcagtc tcttcaattt gagcaatagt	540
tggtgaattt actccaccac ctctctctct tgaaggttct ttcctgctct cctcactata	600
aatgcaggat gacctggaaa ggctaggacc tgagggttcag ttacctgac acaaaggaat	660
tcagtttctc tgatctcata gtcacaggct gccagagctc tacggaacat gcaagatcat	720
ctgctttaag cctcttgttg tggcatctgt tgttttccac tgccctgtac ctattgctct	780
ttccttgggt aacagaacct ttattttctt ctgaaaactc tctgctcagt catggtaggg	840
ccatcagtc acatgatcag gcctctcctg gccaaacatg gcattcttct tttgggaatt	900
tgaatcttaa gctgaatagc tgaagttaa aaaaagctgt tgaatctgac ttacgcctac	960
agtggtcttg caaagtgact gtccattcct atttcttaag tccctgaatt tataatttat	1020
cctggttaca gccctttctg agatgtgttg ttttttttcc aactgtctct tatagtctgt	1080
gaattttcat atttctttc atacatttc atgttttgtt tgtttgttg tgtgtttttt	1140
ggcttttagt aggcagaatc agtttctgtt gtttataccc aaggaatcct gattgataca	1200
tccttccctt ttaaaaataa agtatctaag gctcaaagag agtaggctac ctgcctgagg	1260
tctgggagta agttagtacc agagctcgta ctaaccccag gttagccaac tgctttacac	1320
aacatttgct ctctccttca gagttatagc agtcttggaa gaaagaagct actattttgc	1380
caaagacctc aggaggacca agaacaagtt ctgggatatg tgatgattga actcttaaaa	1440

agtttgttgg	acttctggcc	ataattgtgt	atctaagacc	agatttcatt	cttaatagct	1500
aaacaaacaa	acaagagatc	cacaggttca	gcagctataa	taagagtga	ttactgatac	1560
agttgacaac	atgaatatat	ctcagaaacc	atggcatcaa	tgagcaaaaa	aaatccagac	1620
acagaagaat	acgtaccata	tgccctgcatt	tatgtgatat	tctagcattg	tattgtccaa	1680
catagtagcc	agtagcctca	catggctatt	caaattttaag	ttgattaaaa	ttaaagtaaga	1740
ataaaaattt	agctcttcag	tagcgttagc	cacatgtaac	tagtggctac	cacatcagac	1800
ggtgcaaata	tagaatattt	cctttataac	agaaagttct	attggaaaac	aatgttctag	1860
aaaatataca	cataatctat	aaaaacaaaa	agcaagtcag	tgattgtcta	aggccagggg	1920
tgaggggaga	tcgattgcaa	agtggatga	ggaaagtttt	ggggtaatag	ggttgttga	1980
atcttgattg	cgatgaaggc	tactcggtgt	ctaattgtgc	acctcctcag	actgaacact	2040
tggaattggc	gaatttcatt	gtatgtaaat	tatacctcat	aaagtaactc	taagagggtca	2100
agtgttttgt	ggaaattatt	tttaatcagt	tgcaataactt	attatgagat	gatttttgca	2160
aatacataaa	catgttattc	atccattagg	tgcaatattt	ttgctagctc	ctgaaaacac	2220
agagatgaat	tagaatagca	agcctgccct	caagctgttc	acaatccagt	acaggagatg	2280
agtctattca	aaaatagcta	gactccagga	agaaagttat	aggtgacctt	acacaaaaaa	2340
gtgcagatat	aattatgtag	gacagtagaa	gtggggaagg	tttcttttat	gtggaaaaaa	2400
gagggagaat	ttttggtctt	tgaaggatga	gcaagatgtg	aatatgcgca	gatggagttt	2460
taaaacattc	ctgggtggagg	gcagaatatg	atccaaggca	caagagcaac	cagaaaaata	2520
tgcaacctag	aggaaagtgc	atgaagggga	gcagttgtaa	aataattttc	atgaatgtaa	2580
gtgagaagaa	tttgtatcat	agacacctga	gtttggcaga	gtgcatgttc	ttggctccta	2640
ggagtcaaga	agaacaaagt	gtccctttct	cctacgttat	gctcagtggg	ccaagtccaa	2700
aacacctttc	cttcccttaag	tactttcttc	tcccctccat	acaaatctaa	agtcttcaca	2760
aacatcattt	aaacaggcag	gtcatgggtca	gaaaggcaat	tgcttttcct	agacttctat	2820
gtacgttatt	atattacaat	ttctgcctaa	aagactctaa	agtcttggaa	aagtttccac	2880
cttgcacatc	aaagatatata	ttcatgcatt	tgtatagtaa	ccttagtccc	ctaagagaat	2940
aaggatgaac	tataaatata	agaagtaatt	atggtaatta	taatatgatt	gccacttatt	3000
tttcacttga	tcgtgtatgg	ttgcatgcta	ctgggtgtct	gttgaattct	agagagtttg	3060
cctctttttc	ctgggtcaac	tctcgccatt	tatttccata	atgcaatagg	agccaatctt	3120
tttcataatt	acttatttaa	aatttgttgc	catttaattt	ctgttcctct	tagcttagta	3180

actttaggat ttttaataa caactattga aatcatgaca tacgtttaaa tgatattatt 3240  
 taaatacgtt aggctataaa ccttttaaat tttttaaaaa aatagatgag tgtggtggct 3300  
 catgcctgta atcccaacac tttgggaagc cgggtcggga ggatagcttg agtccagcag 3360  
 tttgagacca gtcagggcaa cacagcaaga ccccatatct aaaaaaacia aacaaaacia 3420  
 aattacctgg gtatggttgt gtcacctgt agtccaagct acacaggaag ctgaggcaga 3480  
 aggatcactt gagcccagga ggttgaggct gcagtgatcc atgaacgcgc tgctacactc 3540  
 agtctgggtg acagtgaag aagctgtctc aaaaataata aataaataaa aataactttt 3600  
 aaaaaaacia aattaattaa attttaaaaa cacaacacac tagagatggt tgcaaattga 3660  
 ttatttggga gtctatatcc ctggaagtta atttaaaata tttagaagag ttcttcctca 3720  
 tttcctagag acgtcgaatt gtaaataatca gagctagaag gaacactagg gctcgccact 3780  
 ccaaagtgtg gtccaaggac cagcagcatc aagtaacctg ggaacgtgtt agaaatgcag 3840  
 agtcttaggc ctcaccccag acctactgaa ccagaatctg cattacaag atttctaggt 3900  
 gcctcacggg cacattaaaa ctigagaagc tctgcactag aaatcttcac tccaccttc 3960  
 attataaatg gaatcacttg ggctgtggtc acaggaaatt gattattttt aatttcagaa 4020  
 ctttctattt aggtcatcta tatttgctaa tagcaggga gaaagccaaa ctctttaact 4080  
 gcaattaaca aatctataat taattagtta agcaatcttc cttttaagtt ttacattttg 4140  
 tggagcaagc tgtttgattt ggctggggct caggccggcc tgtttgtgaa tttcacaatt 4200  
 cacagatggt agccgctctc gggctaagta aaggaagaga atgtcaagtt ttaaataagct 4260  
 tctcccttcc atcctggctg aagcaacaaa taaaatattt ttatgaaaca cattttgagt 4320  
 tagatttact tacagggaat tgtcaaatct ctctgaaagg gcttttagatt gtctcacaac 4380  
 tttgacatct actgatgtca cctatttaca ggtgtgtcct gtgactaggg ggtgaaggga 4440  
 agatgtgaac tcaccatggt agtgaccgtt agatacacag agtgggtttt tttccccctg 4500  
 ttggagtcta tcctaactga gcttctgaat catatttcat tcaatttcca aatccacaaa 4560  
 accaggataa gtttacagcc catattcaga aaggaaataa attattttgt gtgtagactt 4620  
 tcctgatatt aactgattt gggaatatat gaacaatttt atggtttcct ttcgaagtag 4680  
 gtcaagtcaa agcaaaacca aaaacagcaa aaactgtaag acataaagaa tagagtggag 4740  
 ccgactgaga gattaaaata aactagaata tttttattaa caggcaattt gaaataattt 4800  
 gtgcacttca gaatattcta caataatata ttatttccaa ttttaatatc ttttaagaaaa 4860  
 ttactatatt atatgtaagt acatgtgcat gtgtttgagg taggatattt aactcaataa 4920

aggttatttt cttttattcg ggtcaggcaa agcttctaag gggatgtgaa agggatatct 4980  
 ctttctctta gctgagagga agagtgagtt ctaagttaaa tataatcaag gaatttcctt 5040  
 gtctttgcta tttagagattg tgaccacaac aggcgggttg ctgaaaggga aactgaaggg 5100  
 cggggaggga gggaaataga tgaaaaaaca aaacaaaaca aaacttcctt aagcagctct 5160  
 acaaaacatt ttagccccag aaatagtcac agaaatcctc aaatcaaacc agtatccaga 5220  
 tacaaggaag tgttatgtag ctggagcagg gtggacactc atcagctcag ttcagttaca 5280  
 aaagtcagg ctgctgaaat taaactctga tgccattcat gccagcatcc aatcacgaca 5340  
 gagatcagaa gttcagagat gcctccagct ccaaattgcc aacaacaagt gtggctacta 5400  
 tacgtcaagg actctgaagc cgtgagagag ggggaagaac aacagtagag aggatgccca 5460  
 gctggtaaga atcgagtgtt tatgaagttt tagtcaattg atgaatctca ttggctaaaa 5520  
 tcaagaaacg ctccgctctt ttgcaaatat gtatgaagga gagaagtgcc taaacttcta 5580  
 tgtctgatag catttgacct tattgctttt agcctcccgg ctttatactt atatatacac 5640  
 aggtatttgt gtatatatta tataattgtt ctccgt 5676

<210> 2

<211> 5 9 6 0

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222> (1) ... (5 6 7 6)

<221> 5' UTR and intron

<222> (5 6 7 7) ... (5 9 6 0)

<400> 2

cagctgttca gggatgtctg gaaaagaagc ccaccacat tgcttctgga cactgggtgt 60  
 gactttggag ggtatcaggt ttgtctgtta aagaaactgc caacctcttc ctgccccaat 120  
 tggcctctgt tcccttgcac gccctctttc cttgggacac tcccttaagg catcttcttg 180  
 acattaactt aactataaat gtttatttga tgaatttcag tgacctgaag agagatggag 240

gtcaaatcag aagaagcaca tggctaaggt tgcaatgcac ttgctttttc attgaattaa	300
agtcatttga ataccattca gtttacttaa gttctaggcc cagctttact cctaattgat	360
gtcagactgt agcaaatatt aggtccaaag ttggaagagt tagcaggatc ctctccatga	420
cagaactttg gcttccactt tactaaaata gagatttgtt ggttgagctg cagctatgta	480
cagaaaagtg tcatacaatt aaaaatcacc aaactcagtc tcttcaattt gagcaatagt	540
tggatgaattt actccaccac ctctctctct tgaaggttct ttcctgctct cctcactata	600
aatgcaggat gacctggaaa ggctaggacc tgaggttcag ttacctgac acaaaggaat	660
tcagtttctc tgatctcata gtcacaggct gccagagctc tacggaacat gcaagatcat	720
ctgctttaag cctcttgttg tggcatctgt tgttttccac tgccctgtac ctattgctct	780
tctcttggtt aacagaacct ttattttctt ctgaaaactc tctgctcagt catggtaggg	840
ccatcagtcc acatgatcag gccctctctg gccaaacatg gcatctttct tttgggaatt	900
tgaatcttaa gctgaatagc tgaagttcaa aaaaagctgt tgaatctgac ttacgcctac	960
agtggctttg caaagtgact gtccattcct atttcttaag tccctgaatt tataatttat	1020
ccttggttaca gccctttctg agatgtgttg ttttttttcc aactgtctct tatagtctgt	1080
gaattttcat atttcttttc atacattttc atgttttgtt tgtttgttg tgtgtttttt	1140
ggcttttaggt aggcagaatc agtttctgtt gtttataccc aaggaatcct gattgataca	1200
tccttcccc ttaaaaataa agtatctaag gctcaaagag agtaggctac ctgcctgagg	1260
tctgggagta agttagtacc agagctcgta ctaaccccag gttagccaac tgctttacac	1320
aacatttgct ctctcttca gagttatagc agtcttgga gaaagaagct actattttgc	1380
caaagacctc aggaggacca agaacaagtt ctgggatatg tgatgattga actcttaaaa	1440
agtttgttgg acttctggcc ataatttgtt atctaagacc agatttcatt cttaatagct	1500
<hr/>	
aaacaaacaa acaagagatc cacaggttca gcagctataa taagagtga ttactgatac	1560
agttgacaac atgaatatat ctgagaaacc atggcatcaa tgagcaaaaa aaatccagac	1620
acagaagaat acgtaccata tgccctgcatt tatgtgatat tctagcattg tattgtccaa	1680
catagtagcc agtagcctca catggctatt caaatttaag ttgattaaaa ttaagtaaga	1740
<hr/>	
<del>ataaaaaattt agctcttcag tagcgttagc cacatgtaac tagtggctac cacatcagac</del>	<del>1800</del>
ggtgcaaata tagaatattt cctttataac agaaagttct attggaaaac aatgttctag	1860
aaaatataca cataatctat aaaaacaaaa agcaagtcag tgattgtcta aggccagggg	1920
<hr/>	
tgaggggaga tcgattgcaa agtggtatga ggaaagtttt ggggtaatag gggtgttgga	1980

atcttgattg cgatgaaggc tactcggtgt ctaatgtgtc acctcctcag actgaacact	2040
tggaattggc gaatttcatt gtatgtaaat tatacctcat aaagtaactc taagaggtca	2100
agtgttttgt ggaaattatt tttaatcagt tgcaatactt attatgagat gatttttgca	2160
aatacataaa catgttattc atccattagg tgcaatattt ttgctagctc ctgaaaacac	2220
agagatgaat tagaatagca agcctgccct caagctgttc acaatccagt acaggagatg	2280
agtctattca aaaatagcta gactccagga agaaagttat aggtgacctt acacaaaaaa	2340
gtgcagatat aattatgtag gacagtagaa gtggggaagg tttcttttat gtggaaaaaa	2400
gagggagaat ttttggctct tgaaggatga gcaagatgtg aatatgcgca gatggagttt	2460
taaaacattc ctgggtggagg gcagaatatg atccaaggca caagagcaac cagaaaaata	2520
tgcaacctag aggaaagtgc atgaagggga gcagttgtaa aataattttc atgaatgtaa	2580
gtgagaagaa tttgtatcat agacacctga gtttggcaga gtgcatgttc ttggctccta	2640
ggagtcaaga agaacaaagt gtccctttct cctacgttat gctcagtggg ccaagtccaa	2700
aacacctttc ctcccttaag tactttcttc tcccctccat acaaactctaa agtcttcaca	2760
aacatcattt aaacaggcag gtcatggtca gaaaggcaat tgcttttcct agacttctat	2820
gtacgttatt atattacaat ttctgcctaa aagactctaa agtcttggaa aagtttccac	2880
cttgcacatc aaagatatata ttcatgcatt tgtatagtaa ccttagtccc ctaagagaat	2940
aaggatgaac tataaatata agaagtaatt atggtaatta taatatgatt gccacttatt	3000
tttcaactga tcgtgtatgg ttgcatgcta ctgggtgtct gttgaattct agagagtttg	3060
cctctttttc ctgggtcaac tctcgccatt tatttccata atgcaatagg agccaatctt	3120
tttcataatt acttatttaa aatttggtgc catttaattt ctgttcctct tagcttagta	3180
actttaggat ttttaataa caactattga aatcatgaca tacgttttaa tgatattatt	3240
taaatacgtt aggctataaa ctttttaaat tttttaaaaa aatagatgag tgtgggtggct	3300
catgcctgta atcccaacac ttggggaagc cgggtcggga ggatagcttg agtccagcag	3360
tttgagacca gtcagggcaa cacagcaaga ccccatatct aaaaaaacia aacaaaacia	3420
aattacctgg gtatggttgt gtcacctgt agtccaagct acacaggaag ctgaggcaga	3480
aggatcactt gagcccagga ggttgaggct gcagtgatcc atgaacgcgc tgctacactc	3540
agtctgggtg acagtgaag aagctgtctc aaaaataata aataaataaa aataactttt	3600
aaaaaaciaa aattaattaa attttaaaaa cacaacacac tagagatgtt tgcaaattga	3660
ttatttggga gtctatatcc ctggaagtta atttaaaata tttagaagag ttcttcctca	3720



tttcctagag	acgtcgaatt	gtaaatatca	gagctagaag	gaacactagg	gctcgccact	3780
ccaaagtgtg	gtccaaggac	cagcagcatc	aagtaacctg	ggaacgtgtt	agaaatgcag	3840
agtcttaggc	ctcaccgccag	acctactgaa	ccagaatctg	cattaacaag	atttcttaggt	3900
gcctcacggg	cacattaata	cttgagaagc	tctgcactag	aaatcttcac	tccacctttc	3960
attataaatg	gaatcacttg	ggctgtgggc	acaggaaatt	gattatTTTT	aatttcagaa	4020
ccttctatTT	aggtcatcta	tatttgctaa	tagcagggaa	gaaagccaaa	ctctttaact	4080
gcaattaaca	aatctataat	taattagtta	agcaatcttc	cctttaagtt	ttacattttg	4140
tggagcaagc	tgtttgattt	ggctggggct	caggccggcc	tgtttgtgaa	tttcacaatt	4200
cacagatgtt	agccgctctc	gggctaagta	aaggaagaga	atgtcaagtt	ttaaatagct	4260
tctcccttcc	atcctggctg	aagcaacaaa	taaaatatTT	ttatgaaaca	cattttgagt	4320
tagatttact	tacagggaaa	tgtcaaatTT	ctctgaaagg	gcttttagatt	gtctcacaac	4380
tttgacatct	actgatgtca	cctattttaca	ggtgtgtcct	gtgactaggg	ggtgaaggga	4440
agatgtgaac	tcacatgtt	agtgaccgtt	agatacacag	agtggtTTTT	tttccccctg	4500
ttggagtcta	tcctaactga	gcttctgaat	catatttcat	tcaatttcca	aatccacaaa	4560
accaggataa	gtttacagcc	catattcaga	aaggaaataa	attatTTTgt	gtgtagactt	4620
tcctgatatt	acactgattt	gggaatatat	gaacaattTT	atggtttcct	ttcgaagtag	4680
gtcaagtcaa	agcaaaacca	aaaacagcaa	aaactgtaag	acataaagaa	tagagtggag	4740
ccgactgaga	gattaaaata	aactagaata	TTTTatttaa	caggcaattt	gaaataattt	4800
gtgcacttca	gaatattcta	caataatata	ttattttcaa	ttttaatatc	tttaagaaaa	4860
ttactatatt	atatgtaagt	acatgtgcat	gtgtttgagg	taggatattt	aactcaataa	4920
aggttatTTT	cttttattcg	ggtcaggcaa	agcttctaag	gggatgtgaa	agggatatct	4980
<hr/>						
ctttctctta	gctgagagga	agagtgagtt	ctaagttaaa	tataatcaag	gaatttcctt	5040
gtcttttgcta	tttgagattg	tgaccacaac	aggcggttgg	ctgaaaggga	aactgaaggg	5100
cggggaggga	gggaaataga	tgaaaaaaca	aaacaaaaca	aaacttcctt	aagcagctct	5160
acaaaacatt	ttagccccag	aaatagtcac	agaaatcctc	aatcaaacc	agtatccaga	5220
<hr/>						
tacaaggaag	tgttatgtag	ctggagcagg	gtggacactc	atcagctcag	ttcagttaca	5280
aaagtccagg	ctgctgaaat	taaactctga	tgccattcat	gccagcatcc	aatcacgaca	5340
gagatcagaa	gttcagagat	gcctccagct	ccaaattgcc	aacaacaagt	gtggctacta	5400
<hr/>						
tacgtcaagg	actctgaagc	cgtgagagag	ggggaagaac	aacagtagag	aggatgcccc	5460

gctggtaaga atcgagtgtt tatgaagttt tagtcaattg atgaatctca ttggctaaaa 5520  
 tcaagaaacg ctccgcctct ttgcaaata gtatgaagga gagaagtgcc taaacttcta 5580  
 tgtctgatag catttgaccc tattgctttt agcctcccgg ctttatatct atatatacac 5640  
 aggtatttgt gtatatitaa tataattgtt ctccgttcgt tgatatcaaa gacagttgaa 5700  
 ggaaatgaat tttgaaactt cacgggtgtc caccctacag tactgccctg acccttacat 5760  
 ccagcgggtga gtttgaatgt gacataactt ctctcaaaac ttaattgaag tgccttgtgt 5820  
 attatgaatg tgtcagctgt gtacaaagaa caattcctcc ttgtttagtc agcacagtga 5880  
 tattatittg gactttctgt ggacttaaag tggctctgtg acatattttc tgaatgtctt 5940  
 ttttggttga tatttggatc 5960

<210> 3

<211> 5 6 7 6

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

acggagaaca attatataaa atatacacia atacctgtgt atatatagat ataaagccgg 60  
 gaggctaaaa gcaatagggt caaatgctat cagacataga agtttaggca cttctctcct 120  
 tcatacatat ttgcaaagag gcggagcgtt tcttgatttt agccaatgag attcatcaat 180  
 tgactaaaac ttcataaaca ctcgattctt accagctggg catcctctct actgttgttc 240  
 ttccccctct ctcacggctt cagagtcctt gacgtatagt agccacactt gttgttggca 300  
 atttggagct ggaggcatct ctgaacttct gatctctgtc gtgattggat gctggcatga 360  
 atggcatcag agtttaattt cagcagcctg gacttttgta actgaactga gctgatgagt 420  
 gtccaccctg ctccagctac ataacacttc ctgtatctg gatactggtt tgatttgagg 480  
 atttctgtga ctatttctgg ggctaaaatg tttttagtag ctgcttaggg aagttttgtt 540  
 ttgttttgtt ttttcatcta tttccctccc tccccgccct tcagtttccc tttcagccaa 600  
 ccgccgtgtg tggtcacaat ctcaaatagc aaagacaggg aaattccttg attatattta 660  
 acttagaact cactcttctt ctgagctaag agaaagagat atccctttca catcccccta 720  
 gaagctttgc ctgacccgaa taaaagaaaa taacctttat tgagttaaata atcctacctc 780

aaacacatgc acatgtactt acatataata tagtaatttt cttaaagata ttaaaattgg	840
aaataatata ttattgtaga atattctgaa gtgcacaaat tatttcaaat tgcctgttaa	900
taaaaatatt ctagttttatt ttaatctctc agtcggctcc actctattct ttatgtctta	960
cagtttttgc tgttttttgt tttgctttga cttgacctac ttcgaaagga aaccataaaa	1020
ttgttcataat attcccaaatt cagtgttaata tcaggaaagt ctacacacaa aataatttat	1080
ttcctttctg aatatgggct gtaaacttat cctggttttg tggatttgga aattgaatga	1140
aatatgattc agaagctcag ttaggataga ctccaacagg gggaaaaaaa accactctgt	1200
gtatctaacg gtcactaaca tggtaggttc acatcttccc ttcaccccct agtcacagga	1260
cacacctgta aataggtgac atcagtagat gtcaaagttg tgagacaatc taaagccctt	1320
tcagagaaat ttgacatttc cctgtaagta aatctaactc aaaatgtgtt tcataaaaaat	1380
attttatttg ttgcttcagc caggatggaa gggagaagct atttaaaact tgacattctc	1440
ttcctttact tagcccgaga gcggctaaca tctgtgaatt gtgaaattca caaacaggcc	1500
ggcctgagcc ccagccaaat caaacagctt gctccacaaa atgtaaaact taaagggaag	1560
attgcttaac taattaatta tagatttggt aattgcagtt aaagagtttg gctttcttcc	1620
ctgctattag caaatataga tgacctaaat agaaggttct gaaattaaaa ataatcaatt	1680
tcctgtgacc acagcccaag tgattccatt tataatgaaa ggtggagtga agatttctag	1740
tgcagagctt ctcaagtttt aatgtgcccg tgaggcacct agaaatcttg ttaatgcaga	1800
ttctggttca gtaggtctgg ggtgaggcct aagactctgc atttctaaca cgttcccagg	1860
ttacttgatg ctgctgggtc ttggaccaca ctttgagtg gcgagcccta gtgttccttc	1920
tagctctgat attacaatt cgacgtctct aggaaatgag gaagaactct tctaaatatt	1980
ttaaattaac ttccagggat atagactccc aaataatcaa ttgcaaaca tctctagtgt	2040
gttgtgtttt taaaatttaa ttaatttttg ttttttaaaa gttattttta tttatttatt	2100
atttttgaga cagcttcttg cactgtcacc cagactgagt gtagcagcgc gttcatggat	2160
cactgcagcc tcaacctcct gggctcaagt gatccttctg cctcagcttc ctgtgtagct	2220
tggactacag gtgagcacia ccatacccag gtaattttgt tttgttttgt ttttttagat	2280
atggggctctt gctgtgttgc cctgactggt ctcaaactgc tggactcaag ctatcctccc	2340
gacccggctt cccaaagtgt tgggattaca ggcatgagcc accacactca tctatttttt	2400
taaaaaatat aaaaggttta tagcctaacg tattttaata atatcattta aacgtatgtc	2460
atgatttcaa tagttgttat ttaaaaatcc taaagttact aagctaagag gaacagaaat	2520

taaattggcaa	caaatttttaa	ataagtaatt	atgaaaaaga	ttggctccta	ttgcattatg	2580
gaaataaatg	gcgagagtig	accagagaaa	aagaggcaaa	ctctctagaa	ttcaacagaa	2640
caccagtagc	atgcaaccat	acacgatcaa	gtgaaaaata	agtggcaatc	atattataat	2700
taccataatt	acttcttata	tttatagttc	atccttattc	tcttagggga	ctaaggttac	2760
tatacaaatg	catgaattat	atctttgatg	tgcaagggtg	aaacttttcc	aagactttag	2820
agtcttttag	gcagaaattg	taatataata	acgtacatag	aagtctagga	aaagcaattg	2880
cctttctgac	catgacctgc	ctgtttaaat	gatgtttgtg	aagactttag	atttgtatgg	2940
agggggagaag	aaagtactta	aggaaggaaa	ggtgttttgg	acttggacca	ctgagcataa	3000
cgtaggagaa	agggacactt	tgttcttctt	gactcctagg	agccaagaac	atgcactctg	3060
ccaaactcag	gtgtctatga	tacaaattct	tctcacttac	attcatgaaa	attattttac	3120
aactgctccc	cttcatgcac	tttctctag	gttgcataat	tttctgggtg	ctcttgtgcc	3180
ttggatcata	ttctgccctc	caccaggaat	gttttaaaac	tccatctgcg	catattcaca	3240
tcttgctcat	ccttcaaaga	ccaaaaattc	tccctctttt	ttccacataa	aagaaacctt	3300
ccccacttct	actgtcctac	ataattatat	ctgcactttt	ttgtgtaagg	tcacctataa	3360
ctttcttctt	ggagtctagc	tatttttgaa	tagactcatc	tcctgtactg	gattgtgaac	3420
agcttgaggg	caggcttgct	attctaattc	atctctgtgt	tttcaggagc	tagcaaaaat	3480
attgcaccta	atggatgaat	aacatgttta	tgtatttgca	aaaatcatct	cataataagt	3540
attgcaactg	attaaaaata	atttccacaa	aacacttgac	ctcttagagt	tactttatga	3600
ggtataatth	acatacaatg	aaattcgcca	attccaagtg	ttcagtctga	ggaggtgaca	3660
cattagacac	cgagtagcct	tcacgcaat	caagattcca	acaaccctat	taccccaaaa	3720
ctttctcat	accactttgc	aatcgatctc	ccctcacccc	tggccttaga	caatcactga	3780
cttgcttttt	gtttttatag	attatgtgta	tattttctag	aacattgttt	tccaatagaa	3840
ctttctgtta	taaaggaaat	attctatatt	tgcaccgtct	gatgtggtag	ccactagtta	3900
catgtggcta	acgtactga	agagctaaat	ttttattctt	acttaatttt	aatcaactta	3960
aatttgaata	gccatgtgag	gctactggct	actatgttgg	acaatacaat	gctagaatat	4020
cacataaatg	caggcatatg	gtacgtattc	ttctgtgtct	ggattttttt	tgctcattga	4080
tgccatgggt	tctgagatat	attcatgttg	tcaactgtat	cagtaattca	ctcttattat	4140
agctgctgaa	cctgtggatc	tcttgtttgt	ttgttttagct	attaagaatg	aaatctggtc	4200
ttagatacac	aattatggcc	agaagtccaa	caaacttttt	aagagttcaa	tcacacata	4260

tcccagaact tgttcttggc cctcctgagg tctttggcaa aatagtagct tctttcttcc	4320
aagactgcta taactctgaa ggagagagca aatgttgtgt aaagcagttg gctaacctgg	4380
ggtagtagc agctctggta ctaacttact cccagacctc aggcaggtag cctactctct	4440
ttgagcctta gatactttat ttttaaaggg gaaggatgta tcaatcagga ttccttgggt	4500
ataaacaaca gaaactgatt ctgcctacct aaagccaaaa aacacacaaa caaacaaca	4560
aaacatgaaa atgtatgaaa agaaatatga aaattcacag actataagag acagttggaa	4620
aaaaaaccac acatctcaga aagggtctgta accaggataa attataaatt cagggactta	4680
agaaatagga atggacagtc actttgcaaa gccactgtag gcgtaagtca gattcaacag	4740
ctttttttga acttcagcta ttcagcttaa gattcaaatt cccaaaagaa agatgccatg	4800
tttggccagg agaggcctga tcatgtggac tgatggccct accatgactg agcagagagt	4860
tttcagaaga aaataaaggt tctgttaacc aaggaaagag caataggtac agggcagtg	4920
aaaacaacag atgccaccac aagaggctta aagcagatga tcttgcatgt tccgtagagc	4980
tctggcagcc tgtgactatg agatcagaga aactgaattc ctttgtgtca gggtaactga	5040
acctcaggtc ctagcctttc caggctcatcc tgcatttata gtgaggagag caggaaagaa	5100
ccttcaagga gaggaggtgg tggagtaaat tcaccaacta ttgctcaa at tgaagagact	5160
gagtttgggtg atttttaatt gtatgacact tttctgtaca tagctgcagc tcaaccacac	5220
aatctctatt ttagtaaagt ggaagccaaa gttctgtcat ggagaggatc ctgctaactc	5280
ttccaacttt ggacctaata ttgcttacag tctgacatcg attaggagta aagctgggcc	5340
tagaacttaa gtaaactgaa tggatattcga atgactttaa ttcaatgaaa aagcaagtgc	5400
attgcaacct tagccatgtg cttcttctga tttgacctcc atctctcttc aggtcactga	5460
aattcatcaa ataaacattt atagttaagt taatgtcaag aagatgcctt aaggaggagt	5520
cccaaggaaa gagggcatgc aagggaacag aggccaattg gggcaggaag aggttggcag	5580
tttctttaac agacaaacct gataccctcc aaagtcacac ccagtgtcca gaagcaatgt	5640
gggtgggctt cttttccaga catccctgaa cagctg	5676

<210> 4

<211> 5 6 7 6

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

acggagaaca auuauauaaa auauacacaa auaccugugu auauauagau auaaagccgg	60
gaggcuaaaa gcaauagggu caaauuguau cagacauaga aguuuaggca cuucucuccu	120
ucauacauau uugcaaagag gcggagcguu ucuugauuuu agccaaugag auucaucaau	180
ugacuaaaac uucauaaaca cucgauucuu accagcuggg cauccucucu acuguuguuc	240
uuuuuuuuu cuacacggcuu cagaguccuu gacguauagu agccacacuu guuguuggca	300
auuuggagcu ggaggcaucu cugaacuucu gaucucuguc gugauuggau gcuggcauga	360
auggcaucag aguuuaauuu cagcagccug gacuuuugua acugaacuga gcugaugagu	420
guccaccug cuccagcuac auaacacuuc cuuguaucug gauacugguu ugauuugagg	480
auuucuguga cuauuucugg ggcuaaaaug uuuuguagag cugcuuaggg aaguuuuguu	540
uuguuuuguu uuuucaucua uuucccuccc uccccgcccu ucaguuuuccc uuucagccaa	600
ccgccuguug uggucacaau cucaauuagc aaagacaggg aaauuccuug auuauauuuu	660
acuuagaacu cacucuuccu cucagcuag agaaagagau aucccuuua caucccuua	720
gaagcuuugc cugacccgaa uaaaagaaaa uaaccuuuau ugaguuaau auccuaccuc	780
aaacacaugc acauguacuu acauauaaua uaguaauuuu cuuaaagaua uuaaaauugg	840
aaaauauaua uuauuguaga auauucugaa gugcacaaua uauuucaau ugccuguuaa	900
uaaaaaauuu cuaguuuuu uuaaucucuc agucggcucc acucuauucu uuaugucuua	960
caguuuuugc uguuuuuggu uuugcuuuga cuugaccuac uucgaaagga aaccauaaaa	1020
uuguucauau auucccaau caguguaaua ucaggaaagu cuacacacaa aauaauuuau	1080
uuccuuucug aaauugggcu guaaacuau ccugguuuug uggauuugga aaugaauga	1140
aaauanguuc agaagcucag uuaggauaga cuccaacagg gggaaaaaaa accacucugu	1200
guaucuaacg gucacuaaca uggugaguuc acaucuuccc uucacccccu agucacagga	1260
cacaccugua aaauaggugac aucaguagau gucaaaugu ugagacaauc uaaagcccuu	1320
ucagagaaau uugacauuuc ccuguaagua aaucuaacuc aaaauguguu ucauaaaaau	1380
auuuuauuug uugcuucagc caggauaggaa gggagaagcu auuuuuuuuu ugacauucuc	1440
uuccuuuacu uagcccagaga gcggcuuaca ucugugaauu gugaaauuca caaacaggcc	1500
ggccugagcc ccagccaaau caaacagcuu gcuccacaaa auguaaaacu uaaagggaag	1560
auugcuuaac uaaauaauua uagauuuguu aaugcaguu aaagaguug gcuuucucc	1620

cugcuauuag	caaauauaga	ugaccuaaaau	agaagguucu	gaaauuaaaa	auaaucuuu	1680
uccugugacc	acagcccaag	ugauuccauu	uauaaugaaa	gguggaguga	agauuucuag	1740
ugcagagcuu	cucaaguuuu	aaugugcccg	ugaggcaccu	agaaaucung	uuaaugcaga	1800
uucugguuca	guaggucugg	ggugaggccu	aagacucugc	auuucuaaca	cguucccagg	1860
uuacuugaug	cugcuggucc	uuggaccaca	cuuuggagug	gcgagcccua	guguuccuuc	1920
uagcucugau	auuuacaauu	cgacgucucu	aggaaaugag	gaagaacucu	ucuaaaauuu	1980
uuaaaauaac	uuccagggau	auagacuccc	aaaauaauca	uuugcaaaca	ucucuagugu	2040
guuguguuuu	uaaaaauuua	uuaauuuuug	uuuuuuaaaa	guuauuuuuu	uuuauuuuuu	2100
auuuuugaga	cagcuucung	cacugucacc	cagacugagu	guagcagcgc	guucauggau	2160
cacugcagcc	ucaaccuccu	gggcucaagu	gauccuucug	ccucagcuuc	cuguguagcu	2220
uggacuacag	gugagcacia	ccauaccag	guaauuuugu	uuuguuuugu	uuuuuuagau	2280
auggggucuu	gcuguguugc	ccugacuggu	cucaaacugc	uggacucaag	cuauccuccc	2340
gacccggcuu	cccaaagugu	ugggauuaca	ggcaugagcc	accacacuca	ucuauuuuuu	2400
uaaaaaauuu	aaaagguuuu	uagccuaacg	uaauuaaaau	auaucuuuuu	aacguauguc	2460
augauuucaa	uaguuguuau	uuaaaaaucc	uaaaguuauc	aagcuuagag	gaacagaaau	2520
uaaauggcaa	caaauuuuaa	auaaguaauu	augaaaaaga	uuggcuccua	uugcauuuug	2580
gaaauaaaug	gcgagaguug	acccaggaaa	aagaggcaaa	cucucuagaa	uucaacagaa	2640
caccaguagc	augcaaccuu	acacgaucaa	gugaaaaaua	aguggcaauc	auauuauauu	2700
uaccuauuuu	acuucuuuaa	uuuauaguuc	auccuuauuc	ucuuagggga	cuaagguuac	2760
uauacaaaug	caugaauuau	aucuuugaug	ugcaaggugg	aaacuuuucc	aagacuuuag	2820
agucuuuuag	gcagaaaauug	uaauauaaua	acguacauag	aagucuaagga	aaagcaauug	2880
ccuuucugac	caugaccugc	cuguuuuuuu	gauguuugug	aagacuuuag	auuuguauug	2940
aggggagaag	aaaguacuua	aggaaggaaa	gguguuuuug	acuuggacca	cugagcauaa	3000
cguaggagaa	agggacacuu	uguucuuucuu	gacuccuagg	agccaagaac	augcacucug	3060
ccaaacucag	gugucuauga	uacaaaauuc	ucucacuuac	auucaugaaa	auuauuuuac	3120
aacugcuccc	cuucaugcac	uuuccucuag	guugcauauu	uuucugguug	cucuugugcc	3180
uuggaucaua	uucugcccuc	caccaggaau	guuuuuuuu	uccaucugcg	cauauucaca	3240
ucuugcucau	ccuucuaaga	ccaaaaauuc	ucccucuuuu	uuccacauaa	aagaaaccuu	3300
ccccacuuc	acuguccuac	auaaauauau	cugcacuuuu	uuguguaagg	ucaccuauaa	3360

cuuucuccu	ggagucuagc	uauuuuugaa	uagacucauc	uccuguacug	gauugugaac	3420
agcuugaggg	caggcuugcu	auucuaauuc	aucucugugu	uuucaggagc	uagcaaaaau	3480
auugcaccua	auggaugaa	aacauguua	uguauuugca	aaaaucaucu	cauaauaagu	3540
auugcaacug	auuaaaaaa	auuuccacaa	aacacuugac	cucuuaagagu	uacuuuanga	3600
gguaauauuu	acauacaau	aaaaucgcca	auuccaagug	uucagucuga	ggaggugaca	3660
cauuagacac	cgaguagccu	ucaucgcau	caagauucca	acaaccuau	uaccccaaaa	3720
cuuuccucau	accacuugc	aaucgaucuc	cccucacccc	uggccuuga	caaucacuga	3780
cuugcuuuuu	guuuuuauag	auuaugugua	uauuuucua	aacauuguuu	uccaaauaga	3840
cuuucuguua	uaaaggaaa	auucuaauu	ugcaccgucu	gaugugguag	ccacuaguua	3900
cauguggcua	acgcuacuga	agagcuaaa	uuuuauucuu	acuaauuuu	aaucaacuua	3960
aaauugaaua	gccaugugag	gcuacuggcu	acuauguugg	acaauacaau	gcuagaauau	4020
cacauaaaug	caggcauau	guacguauuc	uucugugucu	ggauuuuuuu	ugcucauuga	4080
ugccaugguu	ucugagauau	auucauguug	ucaacugua	caguaauuca	cucuuaauau	4140
agcugcugaa	ccuguggauc	ucuuguuugu	uuguuuagcu	auuaagaau	aaaucugguc	4200
uuagauacac	aaauauggcc	agaaguccaa	caaacuuiuu	aagaguucua	ucaucacaua	4260
ucccagaacu	uguucuuugu	ccuccugagg	ucuuuggcaa	aauguagcu	ucuuucucc	4320
aagacugcua	uaacucugaa	ggagagagca	aauguugugu	aaagcaguug	gcuaccugg	4380
gguuaguacg	agcucuggua	cuaacuuauc	cccagaccuc	aggcagguag	ccuacucucu	4440
uugagccuua	gauacuuaau	uuuuaaaggg	gaaggauua	ucaaucagga	uuccuugggu	4500
auaaacaaca	gaaacugauu	cugccuaccu	aaagccaaaa	aacacacaaa	caaacaacaa	4560
aaacaugaaa	auguaugaaa	agaaauauga	aaaauccacag	acuauaagag	acaguuggaa	4620
aaaaaaccac	acauucacga	aagggcugua	accaggauaa	auuaauaaau	cagggacuua	4680
agaaauagga	auggacaguc	acuugcaaaa	gccacuguag	gcuagaaguc	gauucaacag	4740
cuuuuuuuga	acuucagcua	uucagcuuaa	gauucaaaau	cccaaaagaa	agaugccaug	4800
uuuggccagg	agaggccuga	ucauguggac	ugauggcccu	accaugacug	agcagagagu	4860
uuucagaaga	aaauaaaggu	ucuguuaacc	aaggaaagag	caauagguac	agggcagugg	4920
aaaacaacag	augccaccac	aagaggcuua	aagcagauga	ucuugcaugu	uccguagagc	4980
ucuggcagcc	ugugacuau	agaucagaga	aacugaauuc	cuuuguguca	ggguaacuga	5040
accucagguc	cuagccuuuc	caggucacuc	ugcauuuua	gugaggagag	caggaaagaa	5100



ccuucaggga gaggaggugg uggaguaaa uacaccaacua uugcucaaa ugaagagacu 5160  
 gaguuuggug auuuuuuuuu guaagacacu uuucuguaca uagcugcagc ucaaccacac 5220  
 aaucucuauu uuaguaaagu ggaagccaaa guucugucau ggagaggau cugcuaacuc 5280  
 uucaacuauu ggaccuaaua uuugcuacag ucugacaucg auuaggagua aagcugggcc 5340  
 uagaacuuaa guaaacugaa ugguaauuca augacuuaa uucaaugaaa aagcaagugc 5400  
 auugcaaccu uagccaugug cuucuucuga uuugaccucc aucucucuuc agguccacuga 5460  
 aaaucauca auaaacuuu auaguuuagu uaaugucaag aagaugccuu aaggagugu 5520  
 cccaaggaaa gagggcaugc aagggaacag aggccauug gggcaggaag agguuggcag 5580  
 uuucuuuac agacaaaccu gauaccucc aaagucacac ccagugucca gaagcaaugu 5640  
 gggugggcuu cuuuuccaga cauccugaa cagcug 5676

<210> 5

<211> 2 5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

cggtgatatc aaagacagtt gaagg 25

<210> 6

<211> 2 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

gtccatgcta atctcaatct tgtttg 26

<210> 7

<211> 2 3

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 7

ccatgtccca gagcacacag aca 23

<210> 8

<211> 2 3

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 8

ctatgggtac actgatcggt ttg 23

<210> 9

<211> 3 0 8

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> gene encoding 5' UTR of p51AmRNA and 165 bases in ORF of p51AmRNA.

<400> 9

```

cgttgatatac aaagacagtt gaaggaaatg aattttgaaa cttcacggtg tgccacccta    60
cagtactgcc  ctgaccctta catccagcgt ttcgtagaaa cccagctcat ttctcttgga    120
aagaaagtta  ttaccgatcc accatgtccc agagcacaca gacaaatgaa ttcttcagtc    180
cagagggtttt ccagcatatac tgggattttc tggaacagcc tatatgttca gttcagccca    240
ttgacttgaa  ctttgtggat gaaccatcag aagatgggtgc gacaaacaag attgagatta    300
gcatggac                                         308
    
```

<210> 1 0

<211> 2 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

---

<400> 10

```

tctgggtgacagtgaagaagctgtctc    28
    
```

<210> 1 1

---

<211> 3 0

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

cttcataaacactcgattcttaccagctgg 30

<210> 12

<211> 1 3 9 4 0

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid gene containing p5lpromoter and neomycin resistance gene

<400> 12

cccgggaggt accgggcccc ccctcgaggt cgacgggtatc gataagcttg atctgttcag	60
ggatgtcttg aaaagaagcc caccacatt gcttctggac actgggtgtg actttggagg	120
gtatcaggtt tgtctgttaa agaaactgcc aacctcttcc tgccccaatt ggcctctgtt	180
cccttgcatt ccctctttcc ttgggacact cccttaaggc atcttcttga cattaactta	240
actataaatg tttatttgat gaatttcagt gacctgaaga gagatggagg tcaaatcaga	300
agaagcacat ggctaagggt gcaatgcact tgctttttca ttgaattaaa gtcattcgaa	360
taccattcag ttactttaag ttctaggccc agctttactc ctaatcgatg tcagactgta	420
gcaaatatta ggtccaaagt tggaagagtt agcaggatcc tctccatgac agaactttgg	480
cttccacttt actaaaatag agatttgttg gttgagctgc agctatgtac agaaaagtgt	540
catacaatta aaaatcacca aactcagtct ctccaatttg agcaatagtt ggtgaattta	600
ctccaccacc tcctctcctt gaagggtcct tcctgctctc ctactataa atgcaggatg	660
acctggaaag gctaggacct gaggttcagt taccctgaca caaaggaatt cagtttctct	720
gatctcatag tcacaggctg ccagagctct acggaacatg caagatcatc tgctttaagc	780
ctcttgttgt ggcattctgt gttttccact gccctgtacc tattgctctt tccttggtta	840

acagaacctt tattttcttc tgaaaactct ctgctcagtc atggtagggc catcagtcca	900
catgatcagg cctctcctgg ccaaacatgg catctttctt ttgggaattt gaatcttaag	960
ctgaatagct gaagttcaaa aaaagctgtt gaatctgact tacgcctaca gtggccttgc	1020
aaagtgactg tccattccta tttcttaagt ccctgaattt ataatttatc ctggttacag	1080
ccctttctga gatgtgtggt tttttttcca actgtctctt atagtctgtg aattttcata	1140
tttcttttca tacattttca tgttttgtt gtttgtttgt gtgttttttg gctttaggta	1200
ggcagaatca gtttctgttg ttataccca aggaatcctg attgatacat ccttccccctt	1260
taaaaataaa gtatctaagg ctcaaagaga gtaggctacc tgcctgaggt ctgggagtaa	1320
gttagtacca gagctcgtac taaccccagg ttagccaact gctttacaca acatttgctc	1380
tctccttcag agttatagca gtcttggag aaagaagcta ctattttgcc aaagacctca	1440
ggaggacca gaacaagttc tgggatatgt gatgattgaa ctcttaaaaa gtttgttggg	1500
cttctggcca taattgtgta tctaagacca gatttcattc ttaatagcta aacaaacaaa	1560
caagagatcc acaggttcag cagctataat aagagtgaat tactgataca gttgacaaca	1620
tgaatatatc tcagaaacca tggcatcaat gagcaaaaaa aatccagaca cagaagaata	1680
cgtaccatat gcctgcattt atgtgatatt ctagcattgt attgtccaac atagtagcca	1740
gtagcctcac atggctattc aaatttaagt tgattaaaat taagtaagaa taaaaattta	1800
gctcttcagt agcgtagcc acatgtaact agtggctacc acatcagacg gtgcaaatat	1860
agaatatttc ctttataaca gaaagttcta ttggaaaaca atgttctaga aaatatacac	1920
ataatctata aaaacaaaaa gcaagtcagt gattgtctaa ggccaggggt gaggggagat	1980
cgattgcaaa gtgggatgag gaaagttttg gggtaatagg gttgttggaa tcttgattgc	2040
gatgaaggct actcggtgtc taatgtgtca cctcctcaga ctgaacactt ggaattggcg	2100
aatttcattg tatgtaaatt atacctcata aagtaactct aagagggtcaa gtgttttgtg	2160
gaaattattt ttaatcagtt gcaatactta ttatgagatg atttttgcaa atacataaac	2220
atgttattca tccattaggt gcaatatttt tgctagctcc tgaaaacaca gagatgaatt	2280
agaatagcaa gcctgccctc aagctgttca caatccagta caggagatga gtctattcaa	2340
aaatagctag actccaggaa gaaagttata ggtgacctta cacaaaaaag tgcagatata	2400
attatgtagg acagtagaag tggggaagggt ttcttttatg tggaaaaaag agggagaatt	2460
tttggctctt gaaggatgag caagatgtga atatgcgcag atggagtttt aaaacattcc	2520
tggtggaggg cagaatatga tccaaggcac aagagcaacc agaaaaatat gcaacctaga	2580

ggaaagtgca tgaaggggag cagttgtaaa ataattttca tgaatgtaag tgagaagaat 2640  
 ttgtatcata gacacctgag tttggcagag tgcatgttct tggctcctag gagtcaagaa 2700  
 gaacaaagtg tccctttctc ctacgttatg ctacagtggc caagtccaaa acacctttcc 2760  
 ttccttaagt actttcttct cccctccata caaatctaaa gtcttcacaa acatcattta 2820  
 aacaggcagg tcatggtcag aaaggcaatt gcttttcccta gacttctatg tacgttatta 2880  
 tattacaatt tctgcctaaa agactctaaa gtcttggaaa agtttccacc ttgcacatca 2940  
 aagatataat tcatgcattt gtatagtaac cttagtcccc taagagaata aggatgaact 3000  
 ataaatataa gaagtaatta tggtaattat aatatgattg ccacttattt ttcacttgat 3060  
 cgtgtatggg tgcatgctac tgggtgttctg ttgaattcta gagagtttgc ctctttttcc 3120  
 tgggtcaact ctgcgccattt atttccataa tgcaatagga gccaatcttt ttcataatta 3180  
 cttattttaa atttgttgcc atttaatttc tgttctctt agcttagtaa ctttaggatt 3240  
 tttaaataac aactattgaa atcatgacat acgttttaaat gatattattt aaatacgtta 3300  
 ggctataaac cttttaaatt ttttaaaaaa atagatgagt gtgggtggctc atgcctgtaa 3360  
 tccaacact ttgggaagcc gggtcgggag gatagcttga gtccagcagt ttgagaccag 3420  
 tcagggcaac acagcaagac cccatatcta aaaaaacaaa acaaaacaaa attacctggg 3480  
 tatggttgtg ctacacctga gtccaagcta cacaggaagc tgaggcagaa ggatcacttg 3540  
 agcccaggag gttgaggctg cagtgatcca tgaacgcgct gctacactca gtctgggtga 3600  
 cagtgaaga agctgtctca aaaataataa ataaataaaa ataactttta aaaaacaaaa 3660  
 attaattaaa ttttaaaaac acaacacact agagatgttt gcaaattgat tatttgggag 3720  
 tctatatccc tggaagttaa tttaaaatat ttagaagagt tcttctcat ttcctagaga 3780  
 cgtcgaattg taaatatcag agctagaagg aacactaggg ctgcgcactc caaagtgtgg 3840  
 tccaaggacc agcagcatca agtaacctgg gaacgtgtta gaaatgcaga gtcttaggcc 3900  
 tcaccccaga cctactgaac cagaatctgc attaacaaga tttctaggtg cctcacgggc 3960  
 acattaaaac ttgagaagct ctgcactaga aatcttcact ccacctttca ttataaatgg 4020  
 aatcacttgg gctgtggtca caggaaattg attattttta atttcagaac ctctatttta 4080  
 ggtcatctat atttgctaag agcagggaag aaagccaaac tctttaactg caattaacaa 4140  
 atctataatt aattagttaa gcaatcttcc ctttaagttt tacattttgt ggagcaagct 4200  
 gtttgatttg gctggggctc aggccggcct gtttgtgaat ttcacaattc acagatgtta 4260  
 gccgtctcg ggctaagtaa aggaagagaa tgtcaagttt taaatagctt ctcccttcca 4320

tcctggctga agcaacaaat aaaatatitt tatgaaacac attttgagtt agatttactt	4380
acagggaaat gtcaaatttc tctgaaaggg ctttagattg tctcacaact ttgacatcta	4440
ctgatgtcac ctatttacag gtgtgtcctg tgactagggg gtgaaggga gatgtgaact	4500
caccatgtta gtgaccgtta gatacacaga gtggtttttt tccccctgt tggagtctat	4560
cctaactgag ctctgaatc atatttcatt caatttcaa atccacaaaa ccaggataag	4620
tttacagccc atattcagaa aggaaataaa ttattttgtg tgtagacttt cctgatatta	4680
cactgatttg ggaatatatg aacaatttta tggtttcctt tcgaagtagg tcaagtcaaa	4740
gcaaaaccaa aaacagcaaa aactgtaaga cataaagaat agagtggagc cgactgagag	4800
attaaaataa actagaatat ttttattaac aggcaatttg aaataatttg tgcacttcag	4860
aatattctac aataatatat tatttccaat tttaatatct ttaagaaaat tactatatta	4920
tatgtaagta catgtgcatg tgtttgaggt aggatattta actcaataaa ggttattttc	4980
ttttattcgg gtcaggcaaa gcttctaagg ggatgtgaaa gggatatctc tttctcttag	5040
ctgagaggaa gagtgagttc taagttaaat ataatcaagg aatttccctg tctttgctat	5100
ttgagattgt gaccacaaca ggcggttggc tgaaaggga actgaagggc ggggaggag	5160
ggaaatagat gaaaaaaca aacaaaaca aacttcccta agcagctcta caaaacattt	5220
tagccccaga aatagtcaca gaaatcctca aatcaaacca gtatccagat acaaggaagt	5280
gttatgtagc tggagcaggg tggacactca tcagctcagt tcagttacaa aagtccaggc	5340
tgctgaaatt aaactctgat gccattcatg ccagcatcca atcacgacag agatcagaag	5400
ttcagagatg cctccagctc caaattgcca acaacaagtg tggctactat acgtcaagga	5460
ctctgaagcc gtgagagagg gggaagaaca acagtagaga ggatgccag ctggtagaa	5520
tcgagtgttt atgaagtttt agtcaattga tgaatctcat tggctaaaat caagaaacgc	5580
tcgcctctt tgcaaatatg tatgaaggag agaagtgcct aaacttctat gtctgatagc	5640
atttgaccct attgctttta gcctccggc tttatatcta tatatacaca ggtatttgtg	5700
tatatattat ataattgttc tccgttcgtt gatgggggat ccactagttc tagagcggcc	5760
tcgagatcta agtaagcttg gcattccggt actgttggta aaatggaaga cgccaaaaac	5820
ataaagaaag gcccggcgcc attctatcct ctagaggatg gaaccgctgg agagcaactg	5880
cataaggcta tgaagagata cgccctggtt cctggaacaa ttgcttttac agatgcacat	5940
atcgaggiga acatcacgta cgcggaatac ttcgaaatgt ccgttcggtt ggcagaagct	6000
atgaaacgat atgggctgaa tacaaatcac agaatcgtcg tatgcagtga aaactctctt	6060

caattcttta tgccggtgtt gggcgcggtta tttatcggag ttgcagttgc gcccgcgaac 6120  
 gacatttata atgaacgtga attgctcaac agtatgaaca tttcgcagcc taccgtagt 6180  
 tttgtttcca aaaaggggtt gcaaaaaatt ttgaacgtgc aaaaaaatt accaataatc 6240  
 cagaaaatta ttatcatgga ttctaaaacg gattaccagg gatttcagtc gatgtacacg 6300  
 ttcgtcacat ctcatctacc tcccgtttt aatgaatacg attttgtacc agagtccttt 6360  
 gatcgtgaca aaacaattgc actgataatg aattcctctg gatctactgg gttacctaag 6420  
 ggtgtggccc ttccgcatag aactgcctgc gtcagattct cgcatgccag agatcctatt 6480  
 tttggcaatc aaatcattcc ggatactgcg attttaagt ttgttccatt ccatcacggt 6540  
 tttggaatgt ttactacact cggaatattg atatgtggat ttcgagtcgt cttaatgtat 6600  
 agatttgaag aagagctgtt tttacgatcc cttcaggatt acaaaattca aagtgcgttg 6660  
 ctagtacc aa cctattttc attcttcgcc aaaagcactc tgattgacaa atacgattta 6720  
 tctaatttac acgaaattgc ttctgggggc gcacctcttt cgaaagaagt cggggaagcg 6780  
 gttgcaaaac gcttccatct tccaggata cgacaaggat atgggctcac tgagactaca 6840  
 tcagctattc tgattacacc cgagggggat gataaaccgg gcgcggtcgg taaagttgtt 6900  
 ccattttttg aagcgaagg tttggatctg gataccggga aaacgctggg cgttaatcag 6960  
 agaggcgaat tatgtgtcag aggacctatg attatgtccg gttatgtaaa caatccgga 7020  
 gcgaccaacg ctttgattga caaggatgga tggctacatt ctggagacat agcttactgg 7080  
 gacgaagacg aacacttctt catagttgac cgcttgaagt ctttaattaa atacaaagga 7140  
 tatcagggtg cccccgtga attggaatcg atattgttac aacaccccaa catcttcgac 7200  
 gcgggcgtgg caggtcttcc cgacgatgac gccggtgaac ttcccgcgcg cgttgttgtt 7260  
 ttggagcacg gaaagacgat gacggaaaaa gagatcgtgg attacgtggc cagtcaagta 7320  
 acaaccgcga aaaagttgcg cggaggagtt gtgtttgtgg acgaagtacc gaaaggtctt 7380  
 accggaacac tcgacgcaag aaaaatcaga gagatcctca taaaggccaa gaaggcgga 7440  
 aagtccaaat tgtaaaatgt aactgtattc agcgatgacg aaattcttag ctattgtaat 7500  
 actgcgatga gtggcagggc ggggcgtaat ttttttaagg cagttattgg tgccttaaa 7560  
 gccttggtgc tacgcctgaa taagtataa taagcggatg aatggcagaa attcgccgga 7620  
 tctttgtgaa ggaaccttac ttctgtgtg tgacataatt ggacaaacta cctacagaga 7680  
 tttaaagctc taaggtaaat ataaaattt taagtgtata atgtgttaaa ctactgattc 7740  
 taattgtttg tgtattttag attccaacct atggaactga tgaatgggag cagtgggtga 7800



atgccttttaa	tgaggaaaac	ctgttttgct	cagaagaaat	gccatctagt	gatgatgagg	7860
ctactgctga	ctctcaacat	tctactcctc	caaaaaagaa	gagaaaggta	gaagacccca	7920
aggactttcc	ttcagaattg	ctaagttttt	tgagtcatgc	tgtgttttagt	aatagaactc	7980
ttgcttgctt	tgctatttac	accacaaaagg	aaaaagctgc	actgctatac	aagaaaatta	8040
tgaaaaaata	ttctgtaacc	tttataagta	ggcataacag	ttataatcat	aacatactgt	8100
tttttcttac	tccacacagg	catagagtgt	ctgctattaa	taactatgct	caaaaattgt	8160
gtaccttttag	ctttttaatt	tgtaaagggg	ttaataagga	atatttgatg	tatagtgcct	8220
tgactagaga	tcataatcag	ccataccaca	ttttagaggg	ttttacttgc	tttaaaaaac	8280
ctcccacacc	tccccctgaa	cctgaaacat	aaaatgaatg	caattgttgt	tgtaacttgc	8340
tttattgcag	cttataatgg	ttacaaataa	agcaatagca	tcacaaattt	cacaaataaa	8400
gcattttttt	cactgcattc	tagttgttgt	ttgtccaaac	tcatcaatgt	atcttatcat	8460
gtctggatcc	ggctgtggaa	tgtgtgtcag	ttaggggtgtg	gaaagtcgcc	aggctcccca	8520
gcaggcagaa	gtatgcaaag	catgcatctc	aattagtcag	caaccatagt	cccgcccca	8580
actccgcccc	tcccgccctt	aactccgccc	agttccgccc	attctccgcc	ccatggctga	8640
ctaatttttt	ttatttatgc	agaggccgag	gccgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	8700
tagtgaggag	gcttttttgg	aggcctaggc	ttttgcaaaa	agcttcacgc	tgccgcaagc	8760
actcagggcg	caagggctgc	taaaggaagc	ggaacacgta	gaaagccagt	ccgcagaaac	8820
ggtgctgacc	ccggatgaat	gtcagctact	gggctatctg	gacaagggaa	aacgcaagcg	8880
caaagagaaa	gcaggtagct	tgcaagtggc	ttacatggcg	atagctagac	tgggcggttt	8940
tatggacagc	aagcgaaccg	gaattgccag	ctggggcgcc	ctctggtaag	gttggaagc	9000
cctgcaaagt	aaactggatg	gctttcttgc	cgccaaggat	ctgatggcgc	aggggatcaa	9060
<hr/>						
gatctgatca	agagacagga	tgaggatcgt	ttcgcatgat	tgaacaagat	ggattgcacg	9120
caggttctcc	ggccgcttgg	gtggagaggc	tattcggtta	tgactgggca	caacagacaa	9180
tcggctgctc	tgatgccgcc	gtgttcgggc	tgctcagcga	ggggcgcccc	gttctttttg	9240
tcaagaccga	cctgtccggt	gccctgaatg	aactgcagga	cgaggcagcg	cggctatcgt	9300
<hr/>						
ggctggccac	gacgggcgtt	ccttgcgcag	ctgtgctcga	cgttgtcact	gaagcgggaa	9360
gggactggct	gctattgggc	gaagtgccgg	ggcaggatct	cctgtcatct	caccttgctc	9420
ctgccgagaa	agtatccatc	atggctgatg	caatgcggcg	gctgcatacg	cttgatccgg	9480
<hr/>						
ctacctgcc	attcgaccac	caagcgaaac	atcgcatcga	gcgagcacgt	actcggatgg	9540

aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg 9600  
aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg 9660  
gcgatgcctg cttgccgaat atcatgggtg aaaatggccg cttttctgga ttcacgcact 9720  
gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg 9780  
ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggg atcgccgctc 9840  
ccgattcgca gcgcacgcgc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga gcgggactct 9900  
ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcc aacagagatt tcgattccac 9960  
cgccgccttc tatgaaagg tgggcttcgg aatcgtttc cgggacgccg gctggatgat 10020  
cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt ctccgccac cccgggctcg atccctcgc 10080  
gagttgggtc agctgctgcc tgaggctgga cgacctcgc gagttctacc ggcagtgcaa 10140  
atccgtcggc atccaggaaa ccagcagcgg ctatccgcgc atccatgcc ccgaactgca 10200  
ggagtgggga ggcacgatgg ccgctttggt cccggatctt tgtgaaggaa ccttacttct 10260  
gtggtgtgac ataattggac aaactaccta cagagattta aagctctaag gtaaataata 10320  
aatttttaag tgtataatgt gttaaactac tgattctaata tgtttgtgta ttttagattc 10380  
caacctatgg aactgatgaa tgggagcagt ggtggaatgc ctttaatgag gaaaacctgt 10440  
tttgctcaga agaaatgcc aatagtgatg atgaggctac tgctgactct caacattcta 10500  
ctcctccaaa aaagaagaga aaggtagaag accccaagga ctttccttca gaattgctaa 10560  
gttttttgag tcatgctgtg tttagtaata gaactcttgc ttgctttgct atttacacca 10620  
caaaggaaaa agctgcactg ctatacaaga aaattatgga aaaatattct gtaaccttta 10680  
taagtaggca taacagttat aatcataaca tactgttttt tcttactcca cacaggcata 10740  
gagtgtctgc tattaataac tatgctcaaa aattgtgtac ctttagcttt ttaatttgta 10800  
aaggggttaa taaggaatat ttgatgtata gtgccttgac tagagatcat aatcagccat 10860  
accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg 10920  
aaacataaaa tgaatgcaat tgttgtgtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac 10980  
aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat tttttcact gcattctagt 11040  
tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct ggatccgtcg accgatgccc 11100  
ttgagagcct tcaaccagc cagctccttc cgggtggcgc ggggcatgac tatcgtcgcc 11160  
gcacttatga ctgtcttctt tatcatgcaa ctgtaggac aggtgccggc agcgtcttc 11220  
cgcttcctcg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc 11280

tcactcaaag gcggtaatat ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat 11340  
 gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcggttttt 11400  
 ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg 11460  
 aaaccgcaca ggactataaa gataaccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc 11520  
 tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt 11580  
 ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctg ttcgctccaa 11640  
 gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggttaacta 11700  
 tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa 11760  
 caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa 11820  
 ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt 11880  
 cgaaaaaga gttggtagct ctgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt 11940  
 ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat 12000  
 cttttctacg gggctctgacg ctacgtggaa cgaaaactca cgtaaaggga ttttggatcat 12060  
 gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc 12120  
 aatctaaagt atatatgagt aaacttggct tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc 12180  
 acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta 12240  
 gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga 12300  
 cccacgctca ccggtccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg 12360  
 cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattgtt gccgggaagc 12420  
 tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat 12480  
 cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttatttcagc tccggttccc aacgatcaag 12540  


---

 gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcggtt agctccttcg gtcctccgat 12600  
 cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa 12660  
 ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa 12720  
 gtcattctga gaatagtga tgcggcgacc gatttgcctt tgcccggcgt caatacggga 12780  


---

 taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg 12840  
 gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc 12900  
 acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg 12960  


---

 aaggcaaaat gccgcaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact 13020

```

cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcgatacat 13080
atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt 13140
gccacctgac gcgccctgta gcggcgcat t aagCgCggCg ggtgtggtgg ttacgcgcag 13200
cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gcccgtcct ttcgctttct tcccttcctt 13260
tctcgccacg ttgcgcggct ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttagggtt 13320
ccgatttagt gctttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattagggtg atggttcacg 13380
tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgcccttg acgttgaggt ccacgttctt 13440
taatagtgga ctcttggttc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt 13500
tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattggta aaaaatgagc tgatttaaca 13560
aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgtttaca atttccatt cgccattcag 13620
gctgcgcaac tgttggaag ggcgatcgg t gcgggcctct tcgctattac gccagcccaa 13680
gctaccatga taagtaagta atattaaggt acgtggaggt ttacttgct ttaaaaaacc 13740
tcccacacct cccctgaac ctgaaacata aaatgaatgc aattgttgtt gttaacttgt 13800
ttattgcagc ttataatggt tacaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaataaag 13860
catttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatgta 13920
ctgtaactga gctaacataa

```

13940

# 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

pGL2-neo/p51promoterの制限酵素地図を示す図である。図中のampはアンピシリン耐性遺伝子、neoはネオマイシン耐性遺伝子、lucはルシフェラーゼ遺伝子を示すものである。また、制限酵素名の左に\*印が印されているものは、このベクターをただ一点で切断する酵素である。

## 【図 2】

大腸癌由来細胞株HCT 1 1 6に、様々な刺激を加えた際のp51の発現量をノーザンブロッティングの手法を用いて解析した図である。各レーンには、レーン1、2：タキソール（1  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml）処理細胞、レーン3、4：トリコスタチンA（0.1  $\mu$ g/ml、1  $\mu$ g/ml）、レーン5、6：放射線照射（一平方メートル当たり50J、100J）処理細胞、レーン7、8：ビタミンD3（10nM、10

0nM) 処理細胞、レーン9、10:ビンクリスチン ( $1\mu\text{g/ml}$ 、 $10\mu\text{g/ml}$ ) 処理細胞、レーン11、12:ワートマニン ( $0.1\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ ) 処理細胞のRNA各  $20\mu\text{g}$  がプロットされている。矢印で示した位置にp51プローブと反応するバンドが認められる。

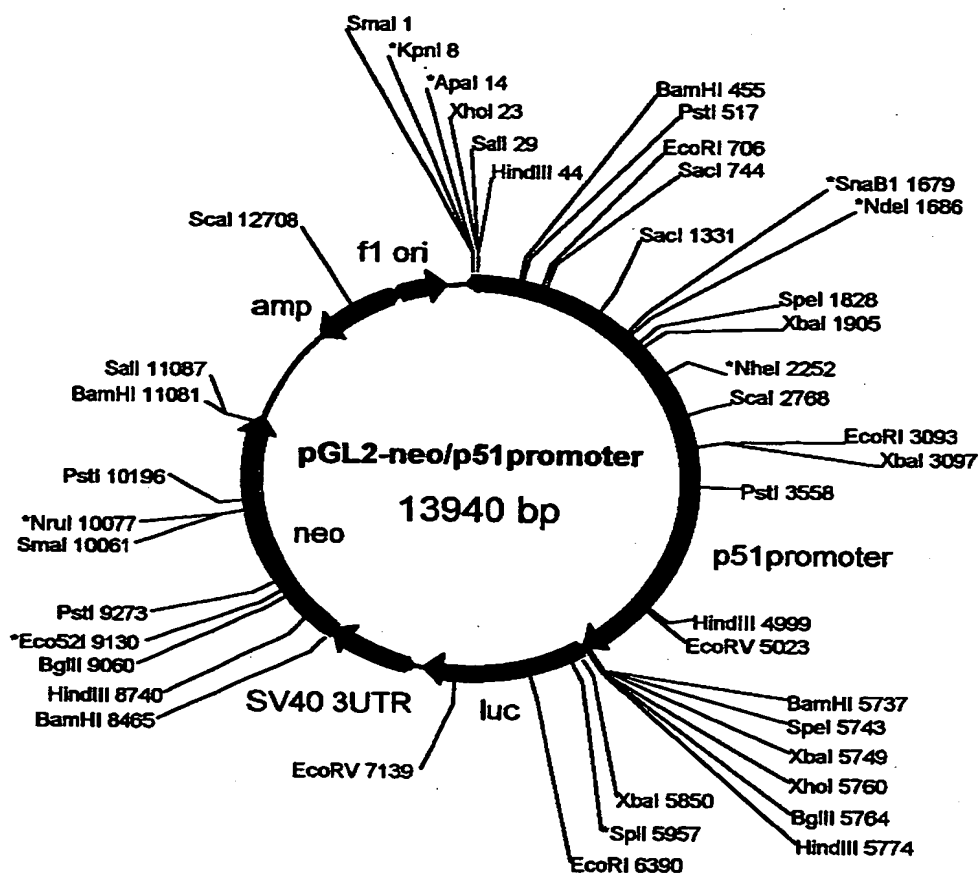
【図3】

大腸癌由来細胞株HCT116に、pGL2-neo/p51promoter又は、pGL2-neoベクター各  $2\mu\text{g}$  を導入した24時間後、0又は  $1\mu\text{g/ml}$  トリコスタチンA (TSA) を添加し、さらに24時間培養した。これらの細胞中のルシフェラーゼ活性を測定することによって、単離した遺伝子断片のプロモーター活性の検討を行った。ネガティブコントロール細胞としてはpcDNA3/lacZ  $2\mu\text{g}$  を導入した細胞を用いた。結果、pGL2-neo/p51promoter導入細胞抽出液はpGL2-neo導入細胞抽出液に比べて有意に高い蛍光強度を示すことがわかった。また、トリコスタチンAの投与によってpGL2-neo/p51promoter導入細胞抽出液中の化学発光強度はさらに増強された。

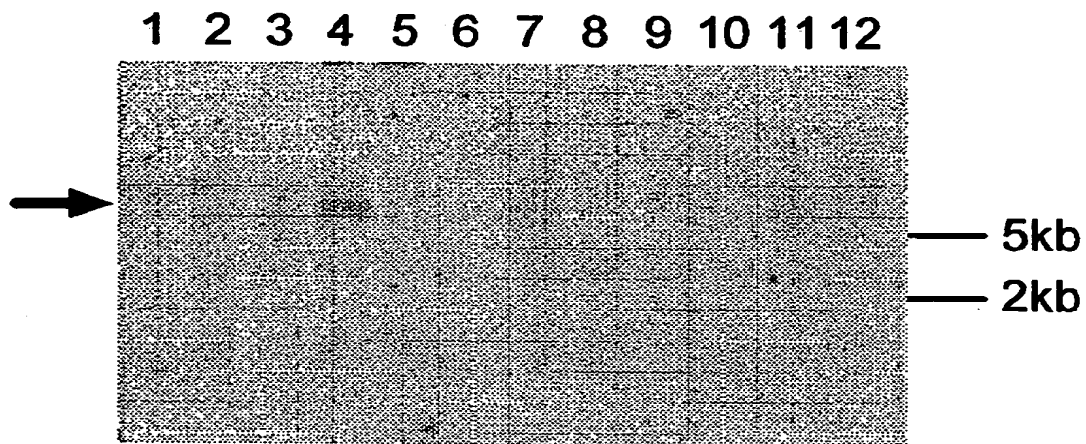
【書類名】

図面

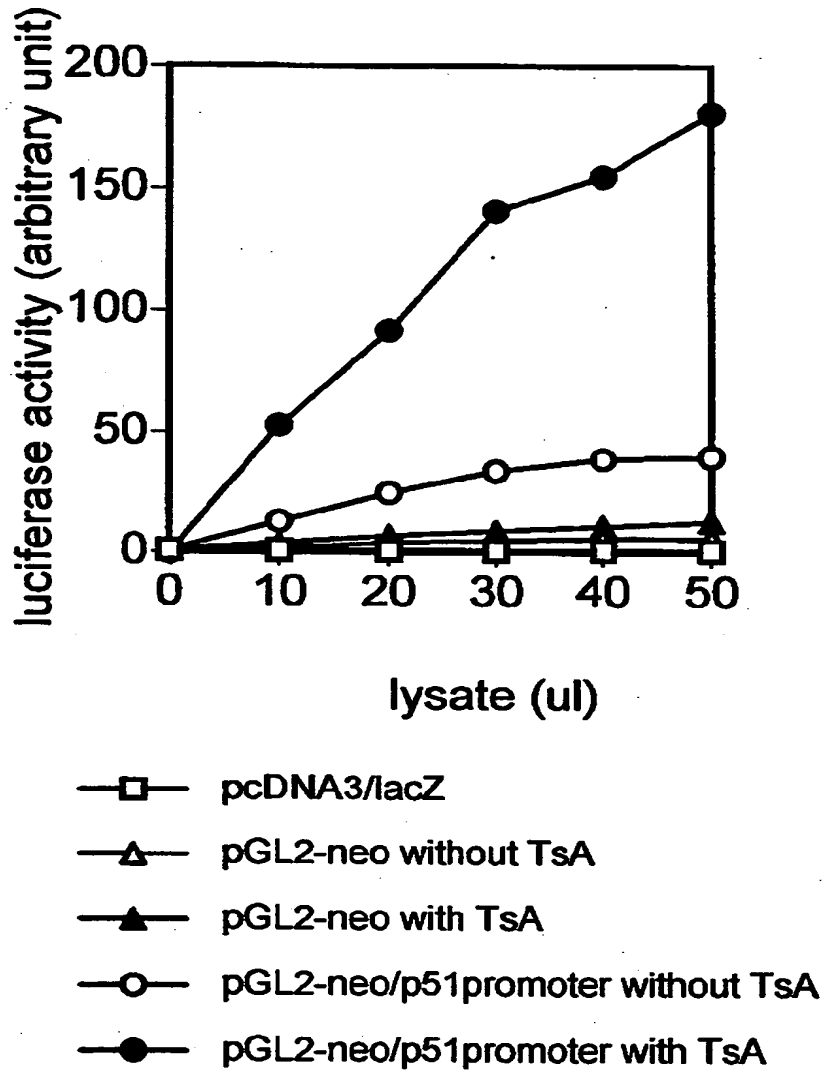
【図 1】



【図2】



【図 3】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒトp51遺伝子のプロモーター、並びに該プロモーター及び目的遺伝子を含む組換え発現ベクター並びに該発現ベクターによって形質転換された形質転換体を提供する。

【解決手段】 配列表の配列番号1で表される塩基配列、又は、該塩基配列において1もしくは複数の塩基が欠失、置換もしくは挿入されたものを含む、ヒトp51遺伝子のプロモーター、並びに該プロモーター及び発現すべき目的遺伝子を含む組換え発現ベクター、並びに該組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換体、更には上記塩基配列から得られる核酸プローブ、アンチセンス遺伝子、それらを利用した薬剤のスクリーニング、それらの医薬製剤への用途に関する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004086]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区富士見1丁目11番2号

氏 名 日本化薬株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599090202]

1. 変更年月日 1999年 6月29日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 京都府京都市左京区松ヶ崎小脇町28-1  
氏 名 酒井 敏行
2. 変更年月日 2000年 3月13日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 京都府京都市左京区松ヶ崎小脇町28-11  
氏 名 酒井 敏行



1  
2  
3

4  
5  
6